

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Bc. Radek Indra

**Aktivita cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4
exprimovaných v eukaryotních a prokaryotních
systémech**

**Activity of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 3A4 expressed in eukaryotic and
prokaryotic systems**

Diplomová práce

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26.4. 2011.

.....

Radek Indra

Rád bych poděkoval své školitel Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání velmi zajímavého tématu, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při vypracování této diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu naší laboratoře za všestrannou pomoc, odborné rady a příjemnou pracovní atmosféru.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	9
1.1. Podstata karcinogenese.....	9
1.2. Faktory ovlivňující karcinogenesy	11
1.3. Biotransformace xenobiotik	12
1.3.1. ..První fáze biotransformace.....	13
1.3.2. Druhá fáze biotransformace	13
1.4. Mikrosomální monooxygenasový systém	14
1.4.1. NADPH:cytochrom P450 reduktasa.....	16
1.4.2. Cytochrom P450	17
1.4.2.1. Nomenklatura cytochromů P450	19
1.4.2.2. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce	20
1.4.2.3. Rekombinantní příprava cytochromů P450 v prokaryotním expresním systému	21
1.4.3. Cytochrom <i>b</i> ₅	23
1.4.3.1. Mechanismus funkce cytochromu <i>b</i> ₅	24
1.5. Ellipticin	25
1.5.1. Biotransformace ellipticinu	26
1.5.2. Mechanismy protinádorového působení ellipticinu.....	26
1.5.3. Tvorba kovalentních aduktů.....	27
2. Cíl práce	30
3. Materiál a metody	31
3.1. Použitý materiál a chemikálie.....	31
3.2. Použité přístroje	32
3.3. Metody.....	33
3.3.1. Stanovení koncentrace proteinu metodou se 4,4'-dikarboxy-2,2'- bicinchoninovou kyselinou (BCA)	33
3.3.2. Stanovení obsahu cytochromu P450.....	34

3.3.3.	<i>Fluorimetrické stanovení množství resorufinu</i>	34
3.3.4.	<i>Separace metabolitu testosteronu</i>	35
3.3.5.	<i>Inkubace rekonstituovaného systému s ellipticinem</i>	36
3.3.6.	<i>Kinetika oxidace ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy</i>	37
3.3.7.	<i>Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti NADPH a NADPH-generujícího systému.....</i>	38
3.3.8.	<i>Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	38
4.	Výsledky	40
4.1.	Kinetika oxidace ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy	40
4.1.1.	<i>Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy izolovanými z nepremedikovaných potkanů (kontrolními mikrosomy).....</i>	40
4.1.2.	<i>Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy potkana premedikovaného Sudanem I</i>	41
4.1.3.	<i>Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy potkana premedikovaného pregnenolon-karbonitrilem (PCN)</i>	42
4.2.	Porovnání enzymové aktivity lidských cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systému	46
4.2.1.	<i>Deethylace 7-ethoxyresorufinu lidským cytochromem P450 1A1</i>	46
4.2.2.	<i>Demethylace 7-methoxyresorufinu lidským cytochromem P450 1A2</i>	44
4.2.3.	<i>6-β-hydroxylace testosteronu lidským cytochromem P450 3A4</i>	48
4.3.	Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systémech.....	49
4.3.1.	<i>Oxidace ellipticinu za pomoci lidského cytochromu P450 1A1</i>	49
4.3.2.	<i>Oxidace ellipticinu za pomoci lidského cytochromu P450 1A2</i>	51
4.3.3.	<i>Oxidace ellipticinu za pomoci lidského cytochromu P450 3A4</i>	53
4.4.	Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti NADPH nebo NADPH-generujícího systému	54
5.	Diskuse.....	57
6.	Závěr.....	62
7.	Seznam použité literatury	65

Abstrakt

Cytochromy P450 (CYP) tvoří superrodinu hemových proteinů, jenž je široce rozšířená v přírodě. Jsou důležité pro metabolismus širokého spektra substrátů a katalyzují řadu chemických reakcí. Hrají centrální roli v metabolismu chemoterapeutik (léčiv). Mají také schopnost aktivovat některé protinádorové činidla. Ellipticin, alkaloid nalezený v rostlinách čeledi Apocynaceae, je příkladem takového substrátu cytochromů P450.

V práci byla testována efektivita lidských rekombinantních cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotickém a prokaryotickém expresním systému, jmenovitě v SupersomechTM, což jsou mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných baculovirem nesoucím cDNA lidských CYP1A1, 1A2 a 3A4 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo v Bactosomech, které jsou membránovou frakcí buněk *E. coli* transfekovaných cDNA stejných lidských cytochromů a NADPH:cytochrome P450 reduktasou, pro oxidaci jejich markerových substrátů a ellipticinu. Cytochrom b₅, fakultativní složka systému oxidas se smíšenou funkcí, která metabolizuje xenobiotika, byl také exprimován v některých systémech.

Výsledky získané v diplomové práci demonstrují, že lidské CYP1A1, 1A2 nebo 3A4 exprimované v prokaryotickém nebo eukaryotickém systému oxidují své markerové substráty (EROD pro CYP1A1/2, MROD pro CYP1A2 a 6β-hydroxylaci testosteronu pro CYP3A4). Oxidují také ellipticin za vzniku až pěti metabolitů: 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticinu a N²-oxid ellipticinu. Jejich účinnost se ale mezi jednotlivými systémy liší. CYP1A1 exprimovaný v prokaryotním systému s reduktasou a cyt b₅ byl nejefektivnější v oxidaci ellipticinu. Převážně byl tvořen 13-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin. Lidský CYP3A4 vykazuje různou schopnost oxidovat ellipticin v závislosti na použitém systému. Prokaryotní systém s CYP3A4 se jeví v oxidaci ellipticinu účinnější. CYP3A4 v přítomnosti cyt b₅ oxidoval ellipticin především na 13-hydroxyellipticin, a to v případě eukaryotního systému, zatímco tento hemový protein (cyt b₅) snižoval oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4 v membránách *E. coli*.

Klíčová slova: cytochromy P450, ellipticin, cytochrom b₅, prokaryotní expresní systém, eukaryotní expresní systém

Abstract

Cytochromes P450 (CYP) are a superfamily of heme proteins distributed widely throughout nature, involved in metabolism of a broad variety of substrates and catalyzing a variety of interesting chemical reactions. They play a central role in metabolism of chemotherapeutic agents. Several prodrug antitumor agents have been found as CYP substrates. Ellipticine, an alkaloid found in Apocynaceae plants, is an example of such type of pro-drug.

Here, we investigate the efficiencies of human recombinant CYPs expressed in eukaryotic and prokaryotic expression systems, namely in SupersomesTM, microsomes isolated from insect cells transfected with baculovirus construct containing cDNA of human CYP1A1, 1A2 and 3A4 with NADPH:CYP reductase or in Bactosomes, the membrane fraction of *E. coli* transfected with cDNA of the same human CYP enzymes and NADPH:CYP reductase to oxidize their marker substrates and ellipticine. Cytochrome b₅, an additional component of the mixed function oxidase system, which metabolize xenobiotics was also expressed in some of the systems.

The results found in this work demonstrate that human CYP1A1, 1A2 or 3A4 expressed in both eukaryotic and prokaryotic systems oxidize their marker substrates (EROD for CYP1A1/2, MROD for CYP1A2 and testosterone 6 β -hydroxylation for CYP3A4). They also oxidize ellipticine, forming up to five metabolites, 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticine and N²-oxide of ellipticine. Their efficiencies, however, differ in individual systems. In the case of ellipticine oxidation, the CYP1A1 expressed in prokaryotic system with reductase and cytochrome b₅ was efficient, forming predominantly 13-hydroxyellipticine and 9-hydroxyellipticine. Human CYP3A4 exhibit different capability of oxidizing ellipticine in eukaryotic and prokaryotic systems, being higher in the later one. In the presence of cytochrome b₅, a pronounced increase in formation of 13-hydroxyellipticine by CYP3A4 was found in the eukaryotic system, whereas this heme protein decreased ellipticine oxidation catalyzed by this enzymes expressed in the membrane of *E.coli*.

Keywords: cytochrome P450, ellipticine, cytochrome b₅, prokaryotic expression system, eukaryotic expression system

Seznam použitých zkratek

AIDS	syndrom získané imunodeficiency
ATP	adenosintrifosfát
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
c	koncentrace
cDNA	complementary DNA
CYP	cytochrom P450
cyt b_5	cytochrom b_5
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EROD	deethylace 7-ethoxyresorufinu
HIV	„human immunodeficiency virus“
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
K_m	rychlostní konstanta enzymové reakce
K_{cat}	číslo přeměny enzymové reakce
M	mol/l
M1-M5	metabolity ellipticinu
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí
MROD	demethylace 7-methoxyresorufinu
$NADP^+$ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotid fosfát (redukovaný)
ompA	vnější membránový protein A (outer membrane protein A)
PAPS	2'-(nebo 3')fosfoadenosin-5-fosfosulfát
PCN	pregnenolon-karbonitril
RPM	počet otáček za minutu
V_{max}	maximální rychlost enzymové reakce
ϵ	molární absorpční koeficient

1. Úvod

Nádorová onemocnění představují v dnešní době jednu z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích [78]. Hlavní příčinnou většiny nádorových onemocnění jsou vnitřní faktory, tzn. faktory geneticky podmíněné, a faktory vnější, ke kterým kromě polutantů životního prostředí můžeme přičíst i životní styl současné lidské společnosti. Výskyt nádorů je ovlivněn jednak příslušností k etnickým skupinám, pohlavím a především věkem. S rostoucím věkem přibývá výskyt jednotlivých typů nádorů [63].

Léčba nádorových onemocnění je komplikována skutečností, že je potřeba zničit buňky těla vlastní, i když pozměněné a ne buňky cizorodé, jako je tomu u bakteriálních infekcí. Odlišnosti od normálních buněk jsou však velmi malé a mohou tedy uniknout pozornosti imunitního systému, případně mohou obsahovat mechanismy, které umožňují paralyzovat některé mechanismy imunitního systému. Přestože by znalost o mechanismu účinku protinádorového léčiva měla být známa dříve než je používán v klinické praxi, jsou tyto údaje u většiny cytostatik doplňovány až dodatečně. Jejich použití se většinou zakládá na empiricky získaných údajích o terapeutické účinnosti a toxicitě. Díky znalosti mechanismu se však dá použití daného léčiva optimalizovat a může dokonce vést i k navržení účinnějších derivátů [57].

1.1. Podstata karcinogenese

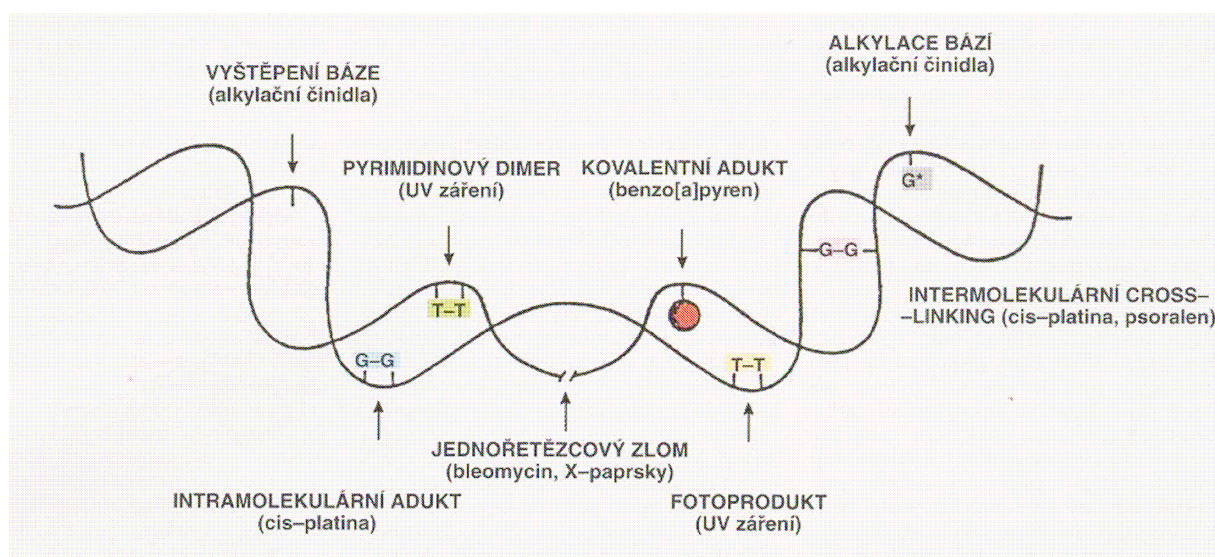
Proces vzniku nádorů se nazývá karcinogenese (případně kancerogenese). Nově vytvořená abnormální tkáň, jenž se vyznačuje nadměrným růstem, čímž poškozuje celý organismus, se označuje jako nádor či tumor případně ještě novotvar. Snad všechny druhy buněk se mohou z nějakého důvodu stát nádorovými buňkami. Maligní nádory vzniklé z epitelálních buněk jsou nazývány karcinomy, ty které vznikly z podpůrných buněk nebo pojivových tkání se nazývají sarkomy [57].

Existuje mnoho kritérií, podle kterých lze nádory třídit. Nejdůležitějším je rozdělení do dvou kategorií na základě agresivity růstu [74]:

- ❖ benigní – rostou lokálně bez zasahování do sousedních tkání
- ❖ maligní – napadají sousední tkáně a vytvářejí metastase

Ve skutečnosti je většina primárních nádorů benigní a neškodná, s výjimkou těch, které tlačí na životně důležité orgány nebo které produkují vysoké hladiny hormonů [74].

Podstatou bezchybného ontogenetického vývoje a diferenciaci každého mnohobuněčného organismu je průběžná regulace exprese genů v buňkách, tedy regulace transkripce (přepis DNA do RNA), postranskripčních úprav, translace (produkce proteinu dle RNA) a posttranslačních úprav. Geny, které se zapojují do této regulace (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory), se nazývají protoonkogeny. Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílejí také tumor supresorové geny, jejichž produkty působí jako přirozená „brzda“ proliferace buněk. Zjednodušeně řečeno, k maligní transformaci buněk dochází v důsledku změny (mutace) v protoonkogenech a tumor supresorových genech. Kromě přirozeně vznikajících chyb při replikaci může být DNA poškozena také působením rozličných vnějších faktorů (Obr. 1.) [57, 74].



Obrázek 1. Příklady mechanismů poškození DNA různými vnějšími faktory [57]

1.2. Faktory ovlivňující karcinogenesy

Hlavní faktory zvětšující pravděpodobnost výskytu nádorů jsou [57]:

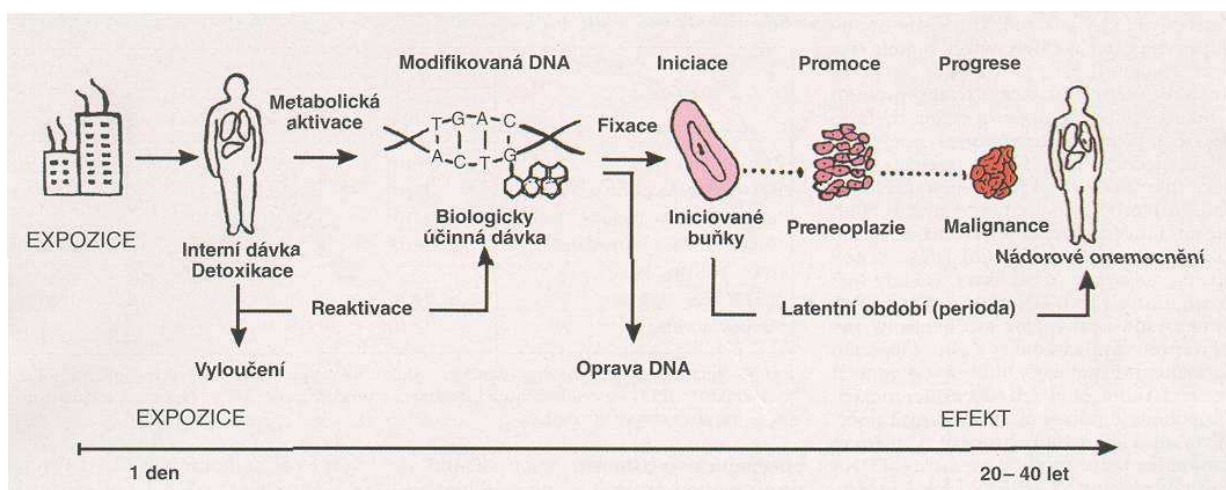
- ❖ fyzikální faktory – různé druhy záření (např. UV záření) a některé druhy jemných pevných částic (např. azbest)
- ❖ biologické faktory – genetické předpoklady a některé viry. Odhaduje se, že až 20 % nádorů je způsobeno onkoviry
- ❖ chemické faktory – chemické karcinogeny

Z více než 600 různých sloučenin testovaných z hlediska karcinogenity Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny (IARC) jich bylo více než padesát ohodnoceno jako karcinogeny vyvolávající nádorová onemocnění u člověka [57]. Chemické karcinogeny lze rozdělit podle mechanismu účinku na tři skupiny:

- ❖ genotoxické karcinogeny – tvoří kovalentní adukty s DNA
- ❖ epigenetické karcinogeny – modifikují DNA nekovalentními interakcemi
- ❖ karcinogeny způsobující změnu struktury molekuly DNA – jedno- a dvou-řetězové zlomy, případně „cross-link“

Proces karcinogeneze se dělí na tři fáze (Obr. 2.) [57]:

- ❖ iniciace
- ❖ promoce
- ❖ progrese

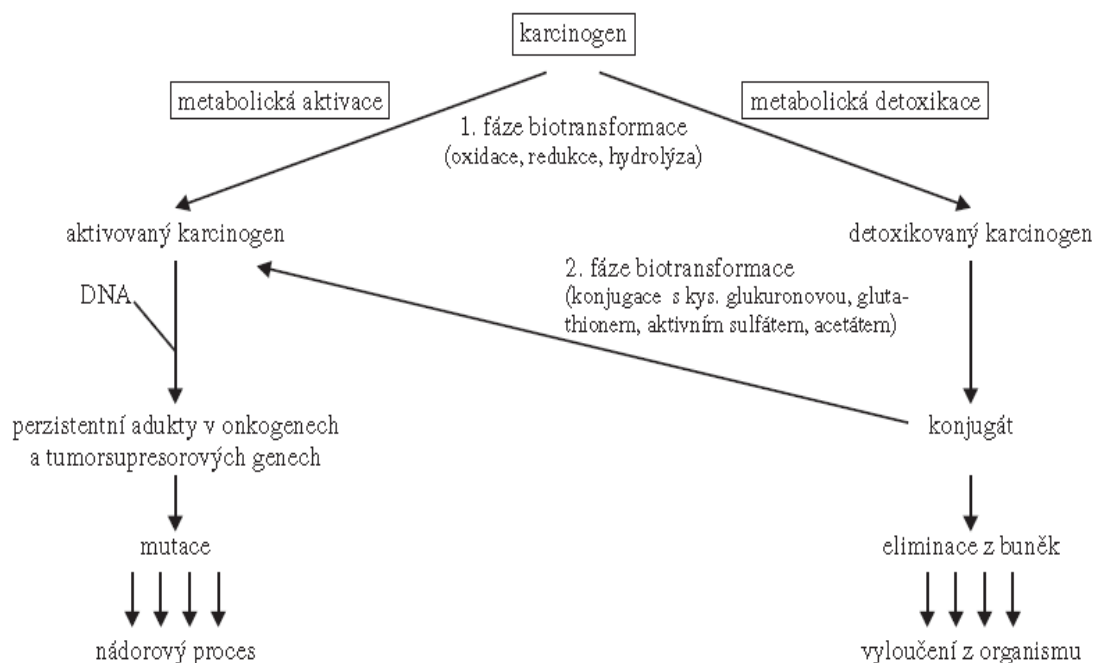


Obrázek 2. Schéma víceetapňové karcinogeneze [57]

Během iniciace je pozměněna genetická informace zdravé buňky, která vede ke vzniku prekarcinogenní leze. Tato leze vzniká především jako následek rozličných modifikací DNA. Z modifikací je důležitá tvorba kovalentních aduktů, hydroxyderivátů bází DNA, tvorba pyrimidinových dimerů případně apurinace či apyrimidace DNA. Vzhledem k tomu, že modifikace je považována za kritický krok karcinogenese, jsou hledány způsoby, jak je detekovat, případně jim předcházet [60].

1.3. Biotransformace xenobiotik

Osud xenobiotika vstupujícího do organismu je do jisté míry ovlivněn jeho rozpustností ve vodě popřípadě v tucích. Látky lipofilní povahy, jenž mohou projít přes membrány a kumulovat se v organismu, nemohou být vyloučeny z těla přímo, ale musí být přeměněny na látky s vyšší polaritou. Tyto hydrofilnější metabolity nemusí být jen netoxické. V závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a enzymové výbavě, jenž ho přeměňuje, se naopak může jednat o látku velmi toxickou. Místo detoxifikace dané látky tak dochází k její aktivaci. Takovouto aktivaci vyžaduje i řada léčiv, ale bohužel je takto aktivováno též asi 98 % genotoxických karcinogenů (Obr. 3.) [57, 61].



Obrázek 3. Schéma možného osudu karcinogenu[61]

Procesy detoxikace a aktivace nelze vzájemně oddělit. Ten samý enzym může detoxikovat jednu chemickou sloučeninu a zároveň aktivovat (zvyšovat toxicitu) jiné látky. Biotransformace xenobiotika u různých druhů není totožná, a to vlivem přítomnosti odlišných enzymových aparátů. U živočichů rozlišujeme dvě fáze biotransformace [57, 61].

1.3.1. První fáze biotransformace

V první fázi biotransformace, nazývané též derivatizační, dochází ke zvýšení polarity xenobiotika. Zvýšení polarity má za následek zvýšení rozpustnosti. Mezi enzymy I. fáze biotransformace patří jednak enzymy mikrosomální frakce (subcelulární systém získaný destrukcí endoplasmatického retikula při homogenizaci buněk) a jednak enzymy cytosolu (cytoplasma s izolačním pufrem). Klíčovým enzymovým systémem této fáze biotransformace je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) obsahující cytochrom P450 [57].

Reakce této fáze jsou oxidační, redukční případně hydrolytické [61]. Nejpočetnější skupinou účastníků se oxidace xenobiotik jsou oxygenasy (nebo hydroxylasy), a to jak monooxygenasy, tak dioxygenasy. Mezi monooxygenasy patří jednak flavinové monooxygenasy a dále MFO systém. Významnou skupinu enzymů při oxidačních reakcích jsou i peroxidasy. Redukční reakce participují na biotransformaci xenobiotik v menší míře než reakce oxidační. Majoritní podíl na redukci mají xanthinoxidasa, DT-diaforasa a NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Aktivní v redukci xenobiotik je i cytochrom P450 [62, 50].

1.3.2. Druhá fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace se též nazývá konjugační. Dochází při ní k vazbě malých hydrofilních molekul na funkční skupiny vytvořené během I. fáze biotransformace. Tento krok vede k dalšímu zvýšení polarity původně hydrofobní molekuly a ulehčí tak její vyloučení z organismu. Při této fázi biotransformace dochází ke konjugaci molekul derivatizovaných v derivatizační fázi s endogeními látkami (např. kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutathion) [57].

Za významnou součást protirakoviných procesů je považován enzym glutathion-S-transferasa, která je schopna vázat reaktivní metabolity, především epoxidy, a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem. γ -Glutamylový zbytek konjugátu s glutathionem je pak odštěpen v ledvinách a glycylový zbytek v játrech. Aminoskupina cysteylového zbytku je dále acetylována

za vzniku merkapturové kyseliny, která už může být vyloučena močí. Glutathion a cystein jsou považovány za „scavengery“ cizorodých látek [57].

K exkreci nejčastěji dochází pomocí moči a žluče. Výkaly jsou vylučovány např. konjugáty fenolických látek se sulfáty nebo konjugáty karboxylových kyselin s glycinem nebo taurinem. Touto cestou také dochází k vylučování kyseliny cholové, která je finálním produktem degradace endogenních steroidních látek [57].

Také během reakcí II. fáze biotransformace může docházet k aktivaci xenobiotik na toxičtější sloučeniny. Typický příklad této aktivace můžeme najít u konjugátů se sulfátem vznikajících z N-hydroxylovaných aromatických aminů vlivem sulfotransferas (sulfát je pro konjugací reakci nejprve aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS)) nebo vlivem acetylace katalyzované N-acetyltransferasou. Konjugát acetátu případně sulfátu s N-hydroxysloučeninou je v kyselém prostředí moči nestabilní a dochází k rozpadu za vzniku nitreniového (respektive karbeniového) iontu. Vzniká tedy elektrofil schopný reagovat s molekulou DNA a proteiny [57].

Většina biotransformačních enzymů vykazuje značnou inducibilitu. Mnoho xenobiotik schopných indukovat enzymy I. fáze biotransformace je současně schopno indukovat i enzymy II. fáze biotransformace. Obecně je indukce enzymů I. fáze vyšší, ale existují i látky případně komplexní faktory, které převážně indukují enzymy II. fáze. Tyto látky se přirozeně nacházejí v rostlinné stravě. Faktory, které stimulují konjugací enzymy mají nesmírný protektivní význam [57].

1.4. Mikrosomální monooxygenasový systém

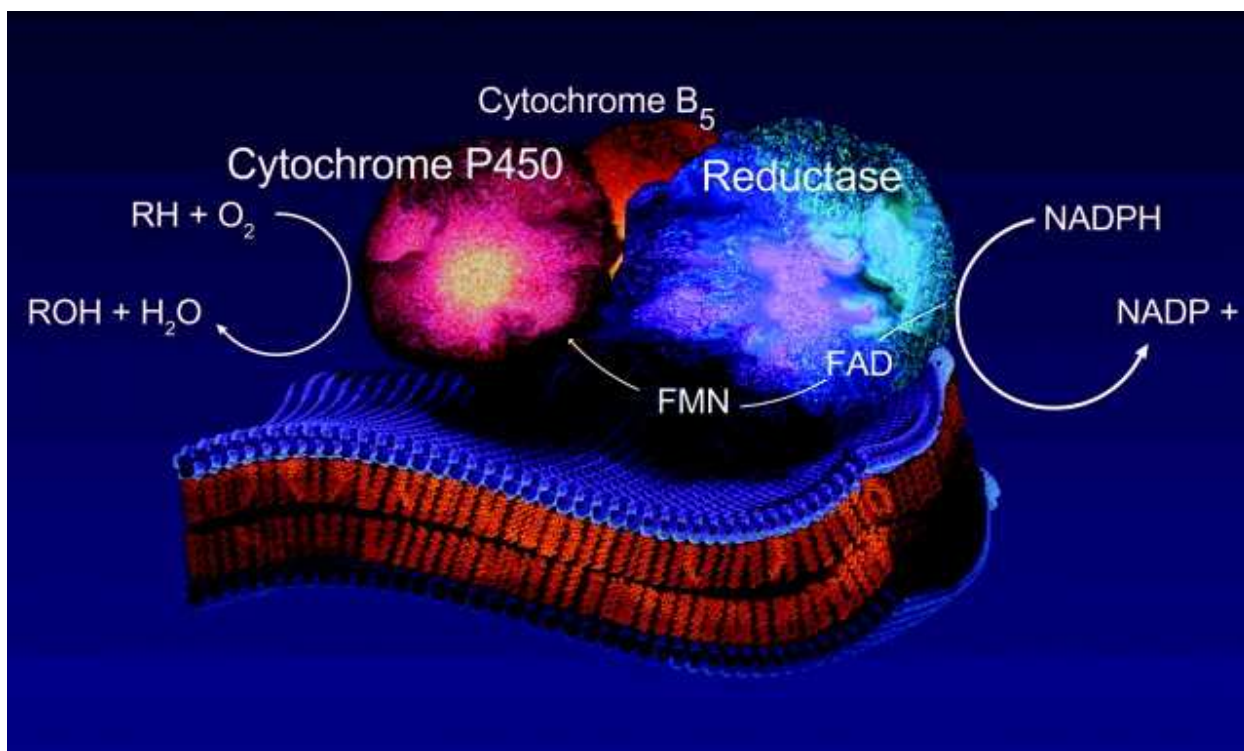
Mikrosomální monooxygenasový systém, též nazývaný systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém), je souborem enzymů katalyzujících celou řadu oxidačních, oxygenačních, případně redukčních reakcí, přičemž při těchto reakcích využívá převážně molekulární kyslík [57]. Skládá se ze třech základních částí (obr. 4.):

- ❖ NADPH:cytochrom P450 reduktasy – flavoproteinový enzym, sloužící jako dělič elektronového páru
- ❖ Cytochromu P450 – hemthiolátový enzym, zastávající roli terminální oxidasy
- ❖ Biologické membrány

Membránové lipidy způsobují konformační změny cytochromu P450 zvyšující jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochromu P450-NADPH:cytochrom P450 reductasy a jsou „zásobárnou“ uložených hydrofobních substrátů cytochromu P450. Fakultativně může MFO systém obsahovat cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasu [57].

Mikrosomální monooxygenasový systém je lokalizován v buňce [60]:

- ❖ v membráně endoplasmatického retikula
- ❖ v membráně mitochondrií



Obrázek 4. Uspořádání částí MFO systému [87]

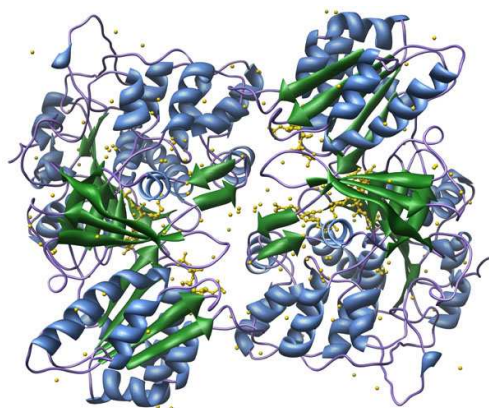
1.4.1. NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (EC 1.6.2.4.) je žlutý membránově vázaný protein. Jedná se o enzym s molekulovou hmotností kolem 80000, který je složkou MFO systému. V tomto systému katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromů P450 [62].

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (Obr. 5.) má dvě funkční domény [62, 17]:

- ❖ hydrofobní N-koncovou doménu (8000) – slouží k ukotvení v membráně a tvorbě funkčního enzymového systému s cytochromem P450
- ❖ hydrofilní C-koncovou doménu (72000) – skládá se z vazebných strukturních domén pro FMN a FAD. FAD a FMN se vzájemně nepřekrývají, místo toho jsou v kontaktu pomocí 7- a 8-methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe.

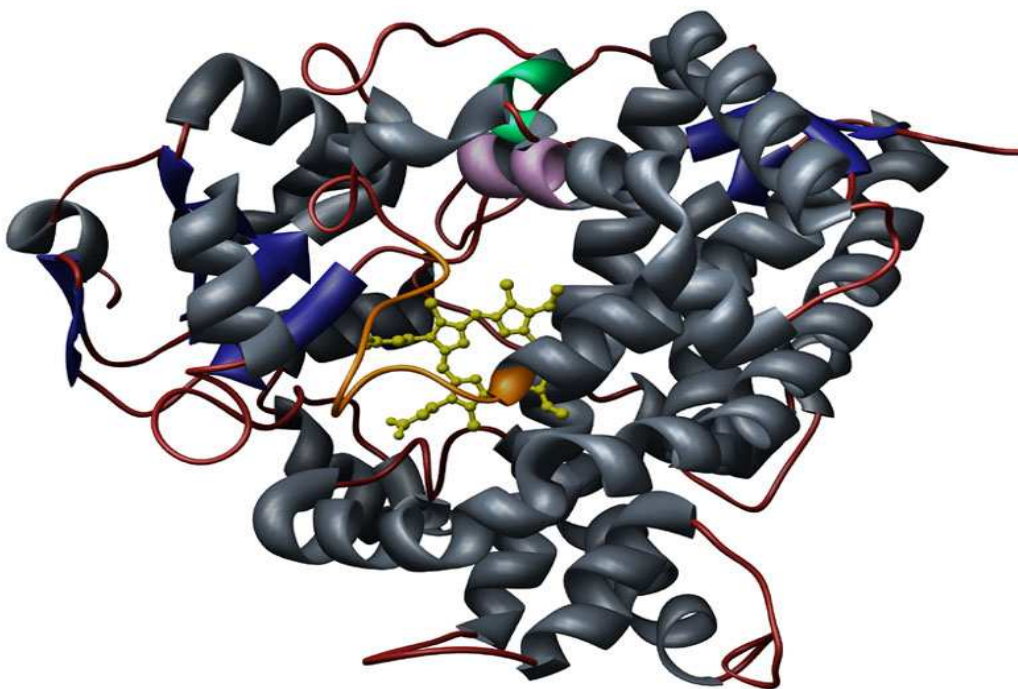
Současná přítomnost FAD a FMN v molekule enzymu umožňuje působit jako dělič elektronového páru a redukovat tak cytochrom P450 v sekvenčně oddělených krocích. Protože NADPH je dvoelektronový donor, umožňuje současná přítomnost FAD a FMN spolu s rychlou elektronovou výměnou mezi nimi, přijetí obou elektronů [40]. Ztráta FMN neovlivňuje vazbu NADPH:cytochrom P450 reduktasy na cytochrom P450, ale způsobuje, že se cytochrom P450 stává neefektivním [69]. Druhou redukci může zprostředkovat i NADH:cytochrom b_5 reduktasa. Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, arginin) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát) [62]. NADPH:cytochrom P450 reduktasa z jednoho organismu může katalyzovat reakce cytochromu P450 z jiného organismu [6].



Obrázek 5. *NADPH:cytochrom P450 reduktasa z potkana [86]*

1.4.2. Cytochrom P450

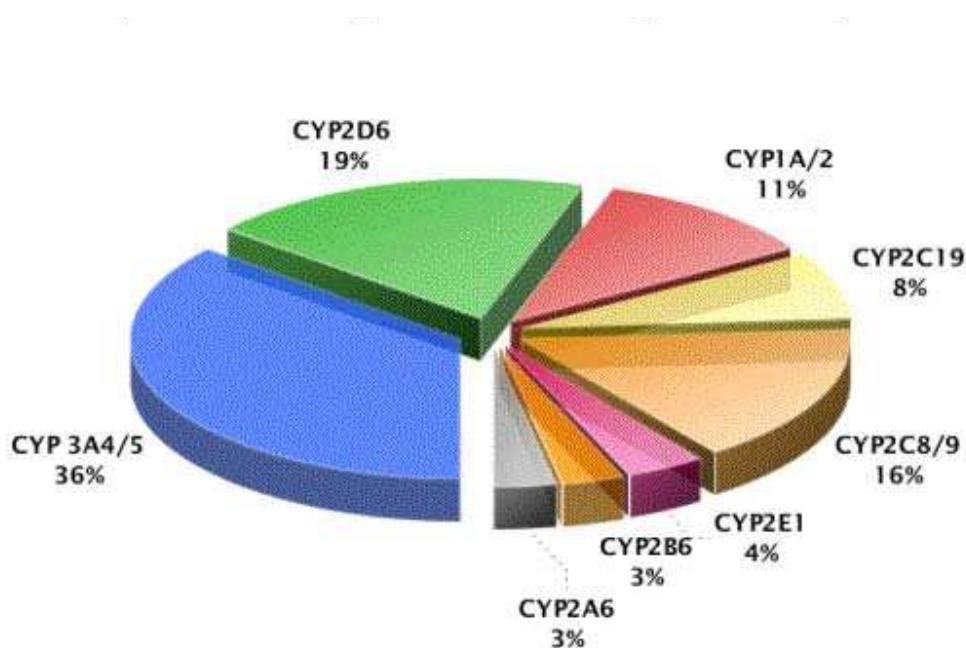
Cytochromy P450 (Obr. 6.) (EC 1.14.14.1.) jsou považovány za velmi staré hemoproteiny, jenž se objevily dříve než hemoglobin. I přes značný rozdíl v substrátové specifitě a struktuře všechny obsahují konzervované oblasti v blízkosti vazného místa hemu [60, 14]. Byly identifikovány v mnoha organismech. Setkáme se s nimi jak u prokaryot tak eukaryot. V eukaryotních buňkách jsou vázány k membráně hladkého endoplasmatického retikula případně mitochondrií [60, 62]. Hem může být v rovině nebo kolmo na rovinu této membrány [10]. V prokaryotních systémech se naopak jedná o rozpustné enzymy. Mají širokou substrátovou specifitu a účastní se biotransformačních reakcí, kde mohou vystupovat jako redukční i oxidační činidla [62, 14].



Obrázek 6. *Lidský cytochrom P450 3A4*[85]

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, ve kterých je porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry cysteinu, přítomného v aktivním centru enzymu. Toto uspořádání je odlišuje od ostatních hemoproteinů. Šestým ligandem je atom kyslíku z molekuly vody [60, 14]. Ve své struktuře také obsahují osm hydrofobních sekvencí, dlouhých 18-23 zbytků, které naznačují výskyt mnohonásobné transmembránové oblasti [16].

V lidském těle se cytochromy P450 vyskytují především v játrech, nicméně i jejich hladiny v plicích, mozku, tenkém střevě nadledvinách či ledvinách jsou významné. Jsou důležité z hlediska metabolismu léčiv a jiných xenobiotik (Obr. 7.). Z jaterních cytochromů P450 jsou v procesu biotransformace xenobiotik nejdůležitější isoenzymy P450 1A2, 2A6, 2C, 2D6, 2E1 a 3A4. Z cytochromů P450 přítomných v jiných tkáních jsou z hlediska metabolismu cizorodých látek významné isoenzymy 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. Množství těchto enzymů v jednotlivých tkáních nejde brát absolutně, protože jejich obsah je závislý na mnoha faktorech, např. genetický polymorfismus, věk, výživa, léčiva, vnější podmínky. Jedná se o enzymy jak konstitutivní, tak indukibilní. Z pohledu celkového množství cytochromů P450 v játrech jsou nejvýznamnější cytochrom P450 3A4 a isoenzymy podrodiny 2C [60].



Obrázek 7. Podíl jednotlivých cytochromů na metabolismu léčiv [83]

Vzhledem ke schopnosti cytochromů P450 katalyzovat reakce, vedoucí ke zvýšení polárnosti substrátů, mohou produkty těchto reakcí být jednak vyloučeny z organismu, nebo se mohou aktivovat a následně se vázat na endogenní látky, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Bereme-li v úvahu úlohu při aktivaci prokarcinogenů, jsou nejvýznamnější cytochromy P450 1A1 a 1A2. Tyto dva isoenzymy se liší v lokalizaci. CYP1A2 je typickým jaterním enzymem a má velmi širokou substrátovou specifitu. CYP1A1 je naopak v játrech jen v nepatrném množství,

je však zastoupen v jiných tkáních a je indukován u kuřáků. U cytochromů P450 rodiny 2 je potřeba zmínit CYP2A6, který představuje až 4 % celkového cytochromu P450, a který metabolizuje například nikotin či nitrosaminy. Hojně je zastoupena také podrodina 2C, jenž má širokou substrátovou specifitu a hraje roli při metabolismu a účinnosti řady léčiv. Nejvýznamnějším cytochromem P450 z hlediska obsahu i množství substrátů je bezpochyby CYP3A4 [60].

1.4.2.1. Nomenklatura cytochromů P450

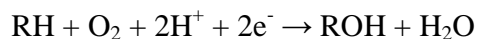
Cytochromy P450 jsou enzymy s bohatou historií. Již před více jak 3,5 miliardy lety umožňovaly mikroorganismům využívat uhlovodíky jako zdroj energie. U vyšších organismů se postupně začaly podílet na synthese životně důležitých endogenních látek jakou je například cholesterol. Postupným vývojem se cytochromy P450 začaly u rostlin účastnit syntézy obranných látek (např. fytoalexinů a fytotoxinů). Naopak živočišné cytochromy P450 si osvojily schopnost toxické látky zneškodňovat [18, 60].

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzymech, isoformách), které jsou na základě podobnosti aminokyselinové sekvence (nikoli dle podobnosti substrátů) řazeny do genetických rodin (sekvenční homologie větší než 40 %) a podrodin (homologie větší než 55 %) [b78]. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou cytochromu P450 (**CYP3**), následuje velké písmeno označující podrodinu (**CYP3A**) [38]. Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny (**CYP3A4**) [38]. Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a spolupracovníky [36].

U člověka byly dosud nalezené formy cytochromů P450 klasifikovány do 18 rodin [b78]. Metabolismu léčiv (xenobiotik) se účastní pouze 3 rodiny cytochromů P450: CYP1, CYP2 a CYP3. Ostatní rodiny participují na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové, biosynthese steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin apod. [b78].

1.4.2.2. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Obecný průběh monooxygenasové reakce cytochromu P450 jde vyjádřit sumární rovnicí



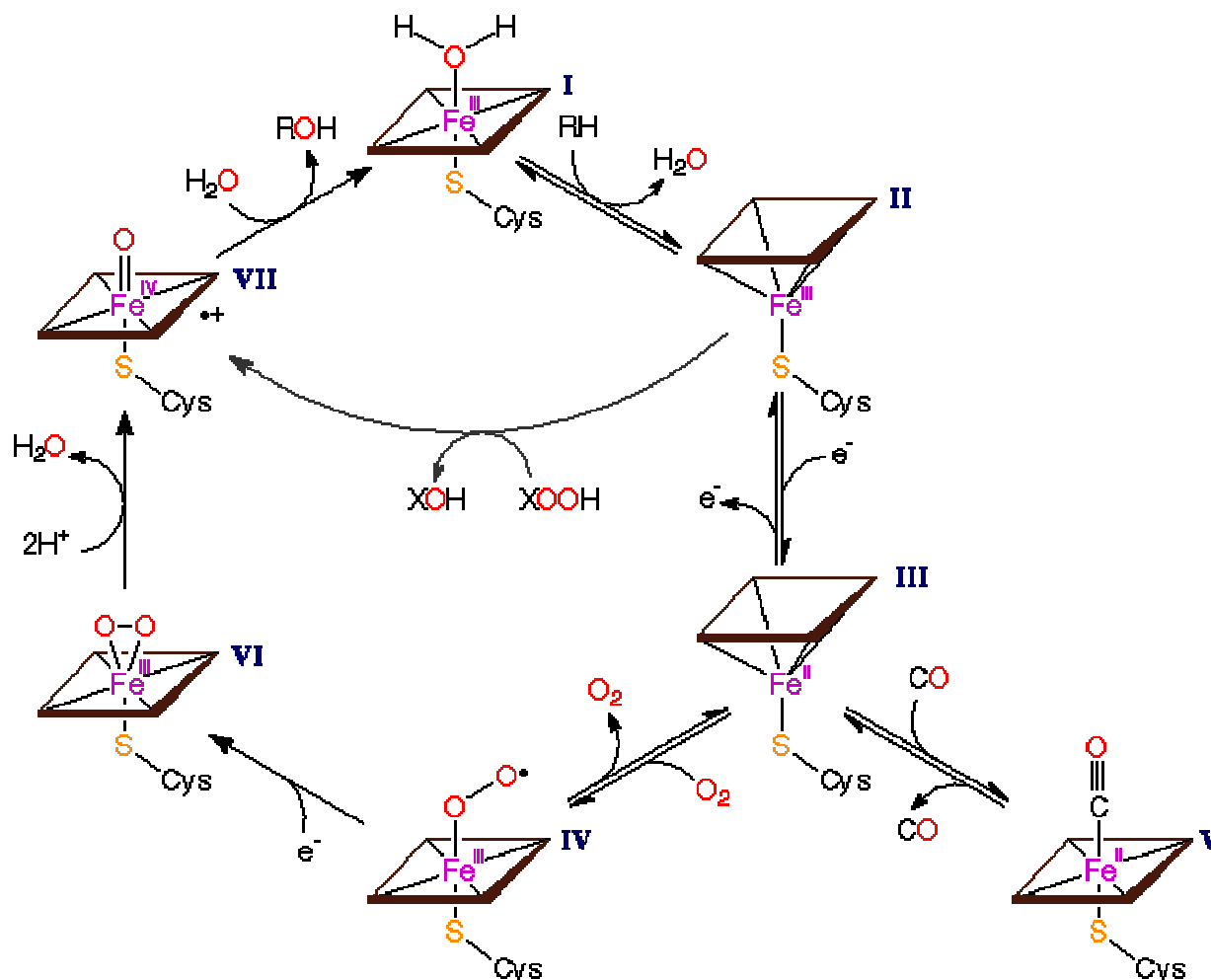
Reakční cyklus cytochromů P450 (Obr. 8.) probíhá uspořádaným mechanismem a skládá se z osmi kroků [62]:

1. V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (ox. č. III) a je hexakoordinované (tedy v nízkospinovém stavu). Šestá valence je obsazena molekulou vody.
2. Po vstupu substrátu [RH] do aktivního místa dojde k vytlačení molekuly vody a železo se stane pentakoordinovaným (vysokospinový stav). Dochází i k změně struktury.
3. Vazba substrátu umožňuje interakci s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž dojde k redukci železa na ferro formu (ox. č. II). Železo je i nadále pentakoordinované.
4. Navázáním kyslíku se tvoří ternární ferrisuperoxidový komplex.
5. Tento komplex není příliš stabilní a je redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou případně NADH:cytochrom b₅ reduktasou. Tím vzniká peroxidový anion. Pokud není druhý elektron dodán dostatečně rychle, komplex se rozpadá za vzniku superoxidového anionradikálu.
6. Po druhé redukci je již cytochrom P450 plně aktivní a dochází ke štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku je redukován za vzniku vody.
7. Druhý atom kyslíku zůstává navázaný na železe a tvoří tak ferrioxeniový komplex. Ten je stabilizován posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý kyslíkový radikál vytrhne vodík z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu.
8. Oba vzniklé radikály rekombinují za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu.
9. Hydroxyderivát substrátu je následně uvolněn z enzymu.

Přidání druhého redukčního ekvivalentu je považováno za rychlost limitující krok reakce, i když existují studie, které za rychlost limitují krok považují odtržení vodíku, případně odstoupení substrátu [14].

V přítomnosti oxidačních činidel (např. organické peroxidy) může z komplexu III. vznikat přímo stav VII (Obr. 8). Aktivace tímto způsobem vede taktéž k hydroxylaci substrátu. Tato

reakce bývá označována jako peroxidasová aktivita cytochromu P450. Na rozdíl od reakce s NADPH a kyslíkem běží tato reakce neuspořádaným mechanismem [62].



Obrázek 8. Reakční cyklus cytochromu P450 [79].

1.4.2.3. Rekombinantní příprava cytochromů P450 v prokaryotním expresním systému

V řadě studií bylo prokázáno, že pomocí virové transfekce je možné „zanést“ cytochrom P450 do prokaryotních a eukaryotních buněčných linií [5]. Dnes je možné exprimovat cytochromy P450 v několika typech buněk [50]:

- ❖ hmyzích buňkách – k transfekci je používán *baculovirus*. Nedostatkem je vyšší cena těchto buněk, technická náročnost postupu transfekce a nižší hladina NADPH:cytochrom P450 reduktasy, která tedy musí být „koexprimována“

- ❖ savčích buňkách – exprimují přijatelnou hladinu NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Nedostatkem je opět cena, časová náročnost postupu a nízká exprese cytochromů P450
- ❖ kvasinkách – kde je exprimována nižší hladina cytochromů P450 než v bakteriích, modifikace cytochromů P450 se ale podobá modifikacím u vyšších eukaryotů
- ❖ bakteriích – nepoužívanější je *E. coli*

Aktivita různých cytochromů P450 z různých expresních systémů se významně liší. Nejméně účinné se jeví ty, které byly exprimované v savčích buňkách [73].

Užití heterologní exprese cytochromů P450 je důležité z několika důvodů. Takové cytochromy P450 poskytují [71]:

- ❖ možnost studovat aktivitu jednotlivých cytochromů P450 při absenci dalších forem enzymu
- ❖ přípravu vysokého množství daného enzymu
- ❖ vytvoření bioreaktorů pro komerční účely

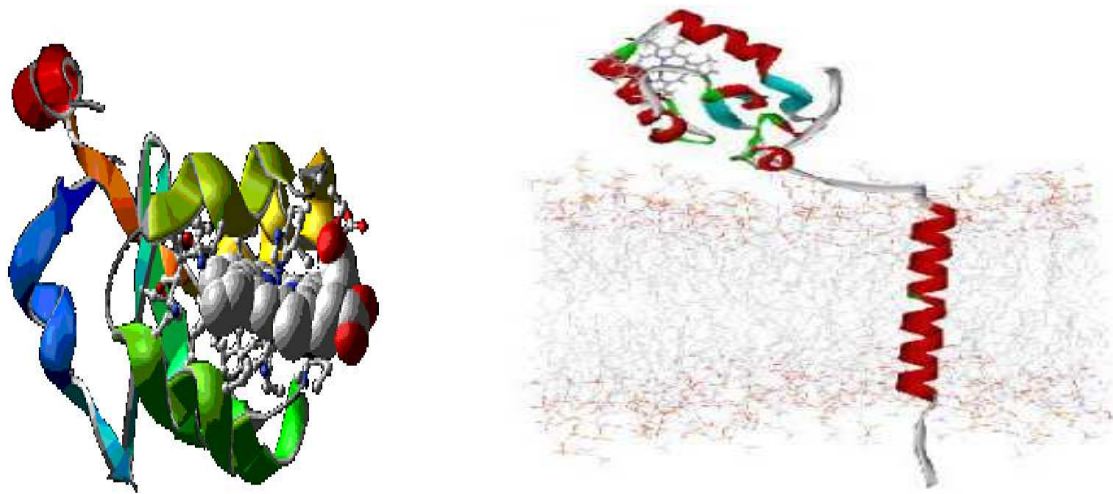
Eukaryotní cytochromy P450, které jsou membránově vázané, jsou bez membrány neefektivní. V prokaryotních systémech by proto nemohli správně fungovat. Z tohoto důvodu se provádí úpravy v sekvenci cDNA pro cytochromy P450, která je používána. Důležitých je prvních osm kodonů [71, 12, 6]. Protože prokaryotní organismy neobsahují NADPH:cytochrom P450 reduktasu, exprese této reduktasy tedy také musí být zabezpečena [9]. Cytochrom P450 se jeví účinnější pokud je „koexprimován“ společně s reduktasou, než pokud je reduktasa přidána až následně [54]. „Koexpresi“ cytochromu P450 a jeho reduktasy je možné provést pod kontrolou dvou promotorů, jednoho promotoru, nebo je vytvořit jako společný fuzní protein [12]. Při expresi CYP2E1 společně s reduktasou pod kontrolou jednoho promotoru bylo prokázáno, že poloha reduktasy vůči cytochromu P450 v daném plasmidu ovlivňuje expresi NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Pokud se reduktasa nachází za cytochromem P450 tak vykazuje nižší expresi, nicméně je jí ale v buňce šestkrát více než cytochromu P450, a to díky její vyšší stabilitě [9]. Tato koexprese se jeví účinnou pro oba enzymy, ale produkovaný cytochrom P450 není ovlivněn cyt b₅, který stimuluje oxidaci některých substrátů při expresi v hmyzích a savčích buňkách [9]. Jiná možnost jak dostat reduktasu do prokaryotní buňky je spojení cytochromu P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy do jednoho fuzního proteinu. Tato možnost byla použita při

expresi CYP1A1 a CYP1A2 [8, 41]. Bylo zjištěno, že na aktivitu rekombinantního cytochromu bez i v konjugaci s reduktasou má vliv složení pufru [41]. Místo modifikace koncových aminokyselin je možné vytvořit fuzní protein, který obsahuje bakteriální sekvenci. Takto připravený cytochrom P450 byl enzymově aktivní a jeho začlenění do membrány bylo lepší. Tato skutečnost byla pozorována v případě CYP3A4, 2E1, 2A6 a 1B1 [47, 53]. Při „koexpresi“ cyt b₅ s CYP3A4 dochází ke stimulaci oxidace testosteronu a nifedipinu. Cyt b₅ má také vliv na stabilitu cytochromu P450. K jeho lepší expresi opět dochází při fúzi s bakteriálním ompA (outer membrane protein A) [69, 72]. Při koexpresi cytochromu P450 se „chaperony“ je dosaženo vyšší exprese cytochromu P450 [30].

1.4.3. Cytochrom b₅

Původně byl cytochrom b₅ nazýván cytochromem m vzhledem k jeho výskytu v mikrosomech. Objevuje se brzy během evoluce. Jedná se o malý kyselý membránový protein, obsahující dvě domény (Obr. 9.). Větší doména je cytosolická a obsahuje hem. Menší doména je hydrofilní a slouží k vazbě do membrány. Hem se nachází v hydrofobní kapse a jeho ion železa je koordinován pomocí dvou histidinů. U savců je 23 ze 134 aminokyselin buď aspartát nebo glutamát. Několik kyselých zbytků a jeden propionát z hemu vyčnívají do rozpouštědla. Histidiny na pozici pátého a šestého ligandu hemu zabraňují přímé interakci s kyslíkem. Nicméně cyt b₅ může sloužit jako přenašeč elektronu mezi reduktasami a oxidačními enzymy. Při interakci cyt b₅ s cytochromem P450 dochází ke změně konformace cytochromu P450 a přechodu z nízkospinové formy tohoto enzymu do formy vysokospinové [52].

O cytochromu b₅ je také známo, že slouží jako elektronový přenašeč v mnoha oxidačních reakcích. Ty zahrnují anabolický metabolismus tuků a steroidů, stejně jako katabolismus xenobiotik a sloučenin endogenního metabolismu [52].



Obr. 9. *Obrázek struktury cytochromu b_5 a jeho navázání k membráně [82, 84].*

1.4.3.1. Mechanismus funkce cytochromu b_5

Působení cytochromu b_5 v rámci MFO systému není ještě zcela objasněné. Doposud je vysvětlováno čtyřmi odlišnými mechanismy:

1. Rychlejší přístup druhého elektronu – Cytochromy P450 jsou jedoelektronové akceptory, které jsou redukovány pomocí NADPH. Příjem druhého elektronu je rychlost limitující krok. Cytochrom b_5 může přijmout elektron a přenést ho následně na cytochrom P450. Cytochrom b_5 musí podstoupit změnu redoxního stavu, aby mohl stimulovat reakce cytochromů P450 [52].

2. Zesílení spojení – Cytochrom b_5 poskytuje druhý elektron s vyšší rychlostí než s jakou dochází k uvolnění superoxidového aniontu. Snížení rychlosti uvolnění superoxidového aniontu je také dáno stabilizací komplexu oxocytochromu P450 [52].

3. Vznik dvouelektronového akceptorového komplexu – Cytochrom b_5 tvoří komplex s cytochromem P450 a ten následně funguje jako douelektronový akceptor. Cytochrom P450 přijme první elektron a předá ho na cyt b_5 , čímž může přijmout okamžitě druhý elektron z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, která následně disociuje a může se vázat kyslík [52].

4. Strukturní vliv na vazbu – při studiích s apo-cyt b_5 (cyt b_5 neobsahující hem) bylo zjištěno, že dochází k stimulaci tvorby, která není důsledkem změny v redoxním stavu cyt b_5 . To potvrzuje efekt cyt b_5 i jako strukturního elementu, který ovlivňuje schopnost monooxygenas podstupovat redoxní změny [52].

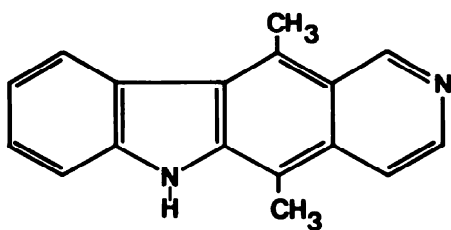
1.5. Ellipticin

Ellipticin, 5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol (Obr. 11.), je rostlinný alkaloid čeledi Toješťovité (Apocynaceae) (ze zástupců např. *Ochrosia borbonica* (Obr. 10.), *Ochrosia elliptica*, *Ochrosia moorei*) [7]. 9-methoxyellipticin (Obr. 12.) byl ve formě laktátu používán při léčbě akutní myeloidní leukémie [2]. Ellipticin a některé jeho polárnější deriváty vykazují také účinnost

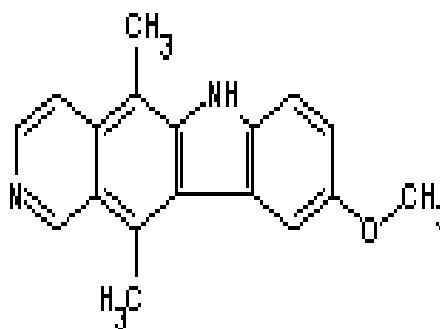
proti nádorům mozku [3, 45], rakovině prsu [33], rakovině plic [34] nebo nádoru tlustého střeva [25]. Ellipticin vykazuje anti-HIV vlastnosti a lze ho tedy použít i při léčbě AIDS [27, 28, 29]. Výhodou tohoto léčiva jsou poměrně nízké vedlejší účinky, které zahrnují nevolnost a zvracení (třetina pacientů) případně hypertenzi (10 % pacientů). Hematologická a jaterní toxicita je prakticky nulová [56]. Nicméně ellipticin vykazuje mutagenitu v řadě testů, např. vůči *Salmonelle* při Amesově testu [55, 26].



Obrázek 10. *Ochrosia borbonica* [76]



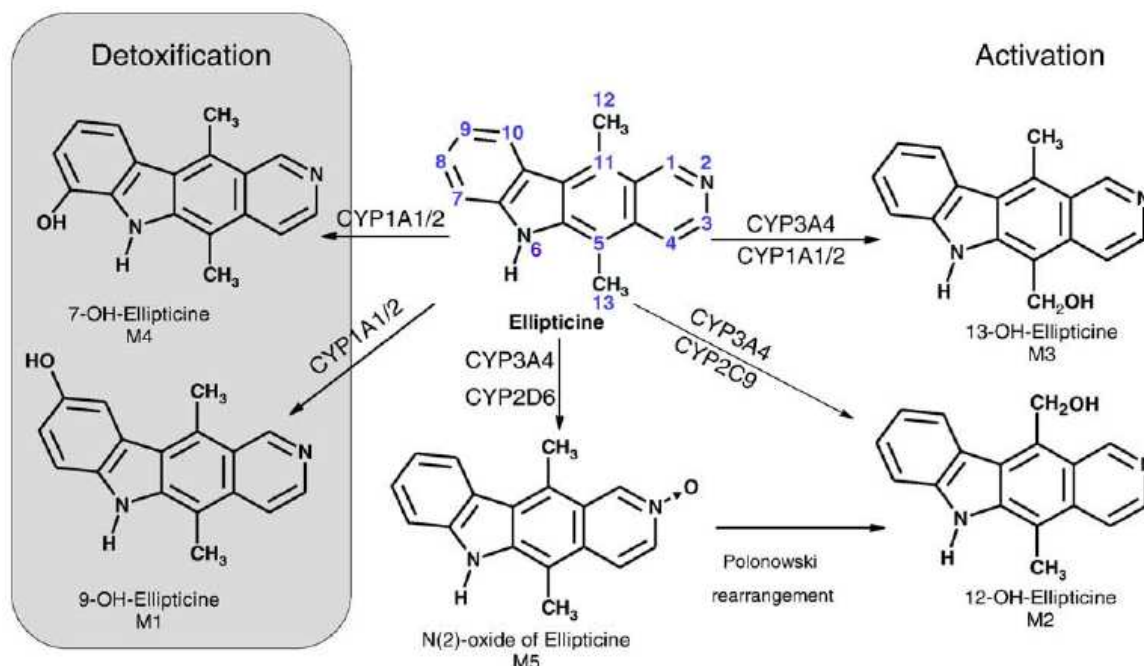
Obrázek 11. *Struktura ellipticinu* [15]



Obrázek 12. *Struktura 9-methoxyelliptici* [81]

1.5.1. Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je v organismu přeměňován cytochromy P450 na 5 metabolitů (Obr. 13.). Tyto metabolity byly určeny jako hydroxylované (oxygenované) metabolity ellipticinu (7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu) [58]. N²-oxid je za testovaných podmínek nestabilní a tvoří 12-hydroxyellipticin [58].



Obrázek 13. *Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450* [56].

Ellipticin je také přeměňován pomocí peroxidas. Při tomto ději vznikají dva produkty, které odpovídají dimeru ellipticinu a N²-oxidu ellipticinu. Ellipticin aktivovaný peroxidasami se může následně vázat na DNA [46, 59].

1.5.2. Mechanismy protinádorového působení ellipticinu

Mechanismus protinádorového působení ellipticinu je vysvětlován několika způsoby:

- ❖ Interkalace ellipticinu do DNA – plyne z tvaru a velikosti molekuly. Přednostně dochází k vazbě na oblasti bohaté na AT a existují tři možnosti, jak mohou ellipticin, případně

jeho deriváty, s DNA interagovat. Díky schopnosti fluoreskovat je ellipticin velmi vhodný pro studium interkalace jako modelová sloučenina [31, 11, 42, 19, 13].

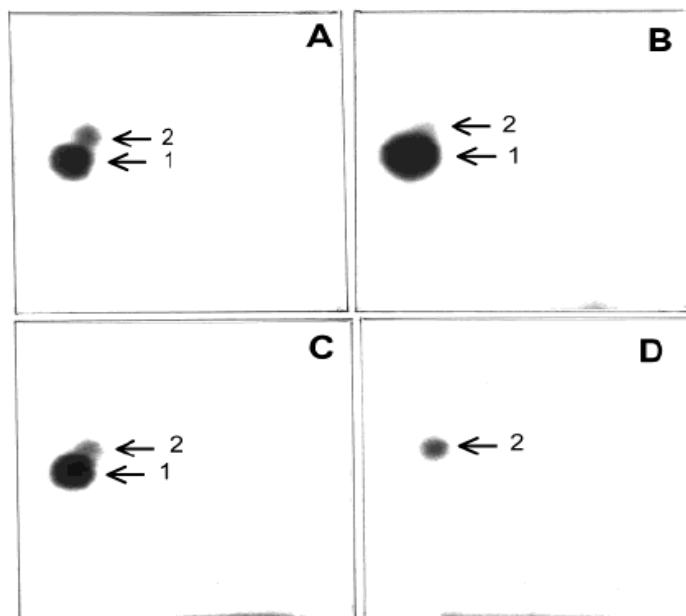
- ❖ Inhibice topoisomerasy II – ellipticin stimuluje štěpení DNA a následný vznik zlomů [topoisomerasa 1, 32, 13]
- ❖ Ovlivnění proteinu p53 – ellipticin zvyšuje expresi proteinu p53 a může také obnovit jeho schopnost vázat se na DNA, která mohla být ztracena vlivem mutace. Následně tak indukuje apoptosu [23, 43, 21, 22].
- ❖ Ovlivnění oxidační fosforylace – ellipticin způsobuje rozpojení oxidační fosforylace v mitochondriích, čímž dochází k výraznému poklesu ATP v buňce [51].

Výše zmíněné mechanismy jsou založeny na nespecifickém působení ellipticinu. K nespecifickým účinkům bychom měli dále přičíst i schopnost ellipticinu a některých jeho derivátů vázat se na proteiny [4, 49] a také schopnost inhibovat cytochromy P450 [1]. Všechny tyto nespecifické účinky jsou však v kontrastu s poměrně úzkou specifiitou vůči nádorovým buňkám. Je tudíž vysoce pravděpodobné, že specifické působení musí vycházet ještě z jiných dosud nediskutovaných principů. Jedním z vysvětlení dané skutečnosti může být rozličná enzymová výbava lidského organismu, který se může lišit v enzymech nutných pro biotransformaci ellipticinu [64].

1.5.3. Tvorba kovalentních aduktů

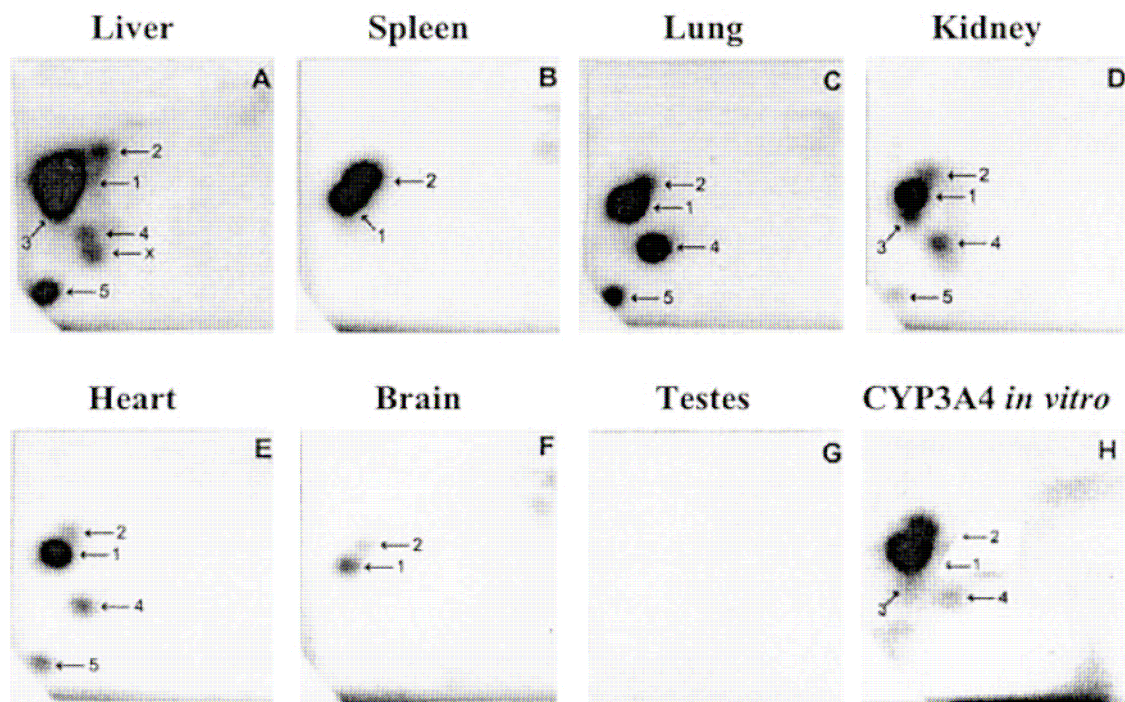
Po aktivaci cytochromy P450 tvoří ellipticin metabolity schopné se kovalentně vázat na DNA. Cílem takto aktivovaného ellipticinu jsou purinové báze v DNA [65, 66].

Tvorba aduktů byla pozorována jak *in vitro*, po aktivaci ellipticinu mikrosomy potkana, králíka i člověka. V těchto systémech jsou tvořeny alespoň dva adukty: adukt 1 a adukt 2 (Obr. 14.). Adukt 1 je závislý na koncentraci cytochromu P450, adukt 2 vzniká i nezávisle na koncentraci tohoto enzymu [65, 126, 66, 68]. Adukt 1 je tvořen 13-hydroxyellipticinem, zatímco adukt 2 je tvořen z 12-hydroxyellipticinu respektive N²-oxidu ellipticinu, který se na 12-hydroxyellipticin přesmykuje [58, 59].



Obrázek 14. Autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA z telecího brzlíku metodou „ ^{32}P -postlabeling“. K aktivaci byly použity mikrosomy (A) potkana, (B) králíka a (C) člověk. (D) kontrolní vzorek bez mikrosomů [66].

Tvorba kovalentních aduktů byla pozorována i *in vivo*, a to v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana exponovaného tomuto protinádorovému léčivu (Obr. 15.). Tvorba aduktů 1 a 2 byla pozorována ve všech zkoumaných orgánech s výjimkou varlat, ve kterých adukty nalezeny nebyly. Kromě těchto hlavních aduktů byla v některých testovaných orgánech pozorována i tvorba dalších 2-3 aduktů, které se tvoří *in vitro* pouze v malých množstvích (Obr. 15.) [67].



Obrázek 15. Autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA izolované z (A) jater, (B) sleziny, (C) plic, (D) ledvin, (E) srdce, (F) mozku a (G) varlat. (H) Autoradiografie DNA inkubované s ellipticinem, NADPH a rekombinantním lidským CYP3A4 rekonstituovaným s NADPH-cytochrom P450 reduktasou in vitro. Adukt X není tvořen ellipticinem. Použitá metoda „³²P-postlabeling“ [67].

2. Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo srovnání aktivity lidských cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému oxidovat modelová xenobiotika. Eukaryotní systém představoval mikrosomy hmyzích buněk transfekovaných *baculovirem* s cDNA lidských cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4 a NADPH:cytochrom P450 reductasy. Jako prokaryotní systém byla použita membránová frakce buněk *E. coli* transfekovaných cDNA stejných lidských enzymů. Cílem práce bylo rovněž porovnat účinnost těchto systémů v závislosti na přítomnosti další složky monooxygenasového systému cytochromů P450, cytochromu b₅. V rámci práce byla také analyzována kinetika oxidace ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy.

Diplomová práce byla vypracována jako součást grantových projektů GAČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie, které byly použity při vypracování této diplomové práce, pocházejí z následujících zdrojů:

Fluka (Švýcarsko)

Methanol, dichlormethan, ethylacetát

Linde (Česká Republika)

Oxid uhelnatý

Lachema Brno / Lachner (Česká Republika)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, dithioničitan sodný, ethylacetát, glycerol, KH_2PO_4 , kyselina octová, methanol, MgCl_2 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH , tartarát sodný, NaClm , aceton, ethanol,

Reanal Budapešť (Maďarsko)

Glukosa-6-fosfát

Sevapharma, a.s. (Česká Republika)

Hovězí sérový albumin (BSA)

Merck (Německo)

Ethylacetát, testosteron

Sigma (USA)

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), dimethylsulfoxid (DMSO), ellipticin, fenacetin, heptansulfonát sodný, NADPH, NADP^+ , glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, resorufin, 7-methoxyresorufinu, 7-ethoxyresorufinu

Lidské cytochromy P450 exprimované v eukaryotním systému byly mikrosomy hmyzích buněk transfekované baculovirem nesoucím cDNA příslušných isoenzymů (SupersomyTM). Dodány byly firmou BD Biosciences. Jako prokaryotní systémy byly použity membrány *E.colli*, transfekovaných cDNA stejných enzymů (Bactosomy). Pocházejí od společnosti CYPEX. Králičí cytochrom b₅ byl izolován na naší katedře.

3.2. Použité přístroje

Automatické pipety

BioHit (Finsko), Nichiryou (Japonsko)

Centrifuga

Sanyo Microcentaur MSE (Velká Británie)

Spektrofotometry

Spektronom 195 D (Maďarsko), Specord M40 (Německo)

Systém HPLC

Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, kolona Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Beckman (USA), kolona Nucleosil 100-5 C18, 5µm, 250 x 4 mm, Macharey-Nagel

Fluorometr

Luminescence Spectrometer Perkin Elmer LS-55 (USA)

Váhy

Analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko), předvážky KERN EW600-2M (Německo)

Další přístroje

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA), sonikátor Ultrasonic Compact Cleaner Teson1 Tesla (Česká Republika), vortex MS 1 Minishaker (Německo), „třepačka“ IKA

VX2 Janke & kunkel (Německo), thermomixer Eppendorf (Německo), termostatová lázeň Julabo TW8 Schoeller Instruments (Německo), magnetická míchačka Variomag Monotherm (Německo)

3.3. Metody

3.3.1. Stanovení koncentrace proteinu metodou se 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA)

Koncentrace proteinu byla určována metodou dle Wiechelmana [75], při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s BCA v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin totiž redukují měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilizované jako vínanový komplex) na měďné, intenzita zabarvení (A_{562}) je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo těsně před použitím připraveno rozpuštěním BCA ve 49 dílech roztoku A (0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO₃, 2 % Na₂CO₃, 0,1 % tartarát sodný, pH 11,25) tak, aby výsledná koncentrace byla 1 % BCA v 50 dílech. Dále byl přidán 1 díl roztoku B (4 % CuSO₄*5H₂O v destilované vodě).

Ke 20 μ l vzorku (ředěného podle potřeby destilovanou vodou) bylo přidáno do pečlivě vyžíhaných zkumavek 480 μ l činidla. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo pipetováno 20 μ l roztoku BSA o známé koncentraci a přidáno 20 μ l destilované vody. Dále se pokračovalo ředěním tzv. „dvojkovou řadou“, přičemž se vždy odebralo 20 μ l z předchozího roztoku a přidalo se 20 μ l destilované vody. Takto připravené roztoky byly přidány k 480 μ l činidla. Připravené roztoky byly inkubovány při teplotě 60 °C po dobu 45 minut. Po jejich ochlazení byla měřena absorbance standardních roztoků BSA při 562 nm proti „slepému“ vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 20 μ l destilované vody. Shodným způsobem byla proměřena i absorbance vzorků. Z hodnot získaných měření byla sestrojena kalibrační křivka. Ta dále sloužila k určení koncentrace proteinu ve vzorcích. Měření bylo provedeno na přístroji Spektronom 195 D v 0,5 ml kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.2. Stanovení obsahu cytochromu P450

Protože cytochromy P450 nemají žádný společný substrát, který by umožnil stanovení aktivity celkového cytochromu P450, využívá se k určení jeho specifického obsahu charakteristické absorpce jeho komplexu v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm [39].

Ke 40 µl vzorku doplněných 1960 µl fosfátového pufru (0,1 M KH₂PO₄, obsahující 2 % glycerol, pH 7,5) bylo přidáno malé množství (~5 mg) dithioničitanu sodného, čímž došlo k redukcí cytochromu P450. Po promíchání byl vzorek rozdělen do dvou kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupaprskovém přístroji Specord M40 proměřena základní linie v rozmezí vlnových délek 400-500 nm. Vzorková kyveta byla následně sycena po dobu 45 sekund proudem oxidu uhelnatého a poté měřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze vzorce:

$$C_{P450} = (A_{450} - A_{490} / \epsilon_{P450}) * \text{ředění} [\mu\text{M}]$$

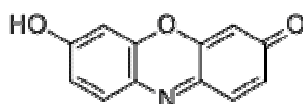
C_{P450}koncentrace cytochromu P450

A_xabsorbance při vlnové délce x nm

ϵ_{P450}molární absorpční koeficient cytochromu P450 ($\epsilon = 0,091 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)

3.3.3. Fluorimetrické stanovení množství resorufinu

Fluorimetrie je metoda založená na měření fluorescenčního světla, jež vysílá látka, která je schopná fluorescence. Jelikož platí úměrnost mezi intenzitou fluorescenčního světla a koncentrací látky, která je schopná fluorescence, lze touto citlivou metodou stanovit množství vznikajícího silně fluorescenčního resorufinu. Resorufin (struktura znázorněna na Obr. 16.) vzniká demethylací 7-methoxyresorufinu, který je „markerovým“ substrátem CYP1A2, případně deethylací 7-ethoxyresorufinu, který je „markerovým“ substrátem CYP1A1.



Obrázek 16. *Struktura resorufinu [80]*

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka pro různé koncentrace resorufinu. Jako standard byl tedy použit resorufin, který je produktem demethylace respektive deethylace 7-methoxyresorufinu respektive 7-methoxyresorufinu. Z kalibrační křivky bylo vypočítáno množství resorufinu (pmol) vytvořeného ve vzorcích. Poté byly připraveny inkubační směsi o objemu 500 μ l a následujícím složení:

- 5 nM cytochrom P450
- 2 μ M 7-methoxyresorufin respektive 7-ethoxyresorufin (0,2 mM zásobní roztoky v DMSO)
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

Inkubační směs připravená do mikrozkušavek Eppendorf tak, aby obsahovala všechny složky kromě NADPH, byla po přidání 7-methoxyresorufinu respektive 7-ethoxyresorufinu 2 minuty inkubována za laboratorní teploty. Do jedné jamky bylo vždy odebráno 150 μ l inkubační směsi. Bylo odebráno vždy do čtyř jamek. Ve třech jamkách byla startována reakce přidáním 17 μ l NADPH, zatímco ke směsi ve čtvrté jamce, která sloužila jako „blank“, bylo přidáno stejné množství pufru.

V experimentu byla změřena fluorescence vzniklého resorufinu v připravovaných inkubačních směsích a jejich příslušných „blanků.“ Inkubační směsi byly měřeny vždy v 10 cyklech. Měření jednoho cyklu bylo „nastaveno“ na dobu 60 sekund. Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství (v jednotkách pmol) vznikajícího resorufinu za minutu na 1 pmol cytochromu P450.

3.3.4. Separace metabolitu testosteronu

„Markerová“ reakce CYP3A4 je 6- β -hydroxylace testosteronu. Jednotlivé reakční směsi o objemu 0,25 ml byly připraveny ve třech paralelních vzorcích a obsahovaly následující složky :

- 50 nM cytochrom P450 3A4 exprimovaný jednak v SupersomechTM a jednak v Bactosomech
- 0,05 mM testosteron (10 mM zásobní roztok v methanolu)
- 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)

- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- Polovina vzorků obsahovala navíc 62,5 nM cytochrom b_5 .

Vzorky byly preinkubovány 5 minut při 37 °C a následně byla „startována“ reakce přidáním 25 μl NADPH- generujícího systému. Směs byla důkladně promíchána a inkubována 15 minut za stálého míchání při 400 RPM a 37 °C v otevřených mikrozkuřkách. Reakce byla zastavena přidáním 100 μl roztoku 1 M Na_2CO_3 /2 M NaCl a následným intenzivním protřepáním. Dále byl k reakční směsi přidán 20 μM fenacetin (zásobní 1 mM roztok v methanolu) a 1 ml dichlormethanu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE). Extrakce byla provedena dvakrát.

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha pod atmosférou dusíku. Vzorky byly uchovány při teplotě -20°C.

Metabolit testosteronu (6- β -hydroxytestosteron) vzniklý reakcí v inkubačních směsích byl separován od testosteronu pomocí RP-HPLC. Separace metabolitu byla prováděna na koloně Nucleosil 100-5 C18, 5 μm , 250 x 4 mm (Macharey-Nagel) při teplotě 35 °C a průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Nástřik vzorku byl 20 μl . K separaci docházelo izokratickou elucí mobilní fáze o složení 75% methanol, 25% destilovaná voda. Mobilní fáze byla před použitím sonikována pro odstranění vzduchu. 6- β -hydroxytestosteron byl detekován při vlnové délce 254 nm a pro kvantifikaci byla jeho plocha vztažena k ploše píku fenacetinu.

3.3.5. Inkubace rekonstituovaného systému s ellipticinem

Inkubační směsi o objemu 0,25 ml byly vždy připraveny ve třech paralelních vzorcích a obsahovaly:

- 25-200 nM cytochrom P450 1A1, 1A2 respektive 3A4 exprimované jednak v SupersomechTM a jednak v Bactosomech
- 10 μM ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

- Polovina vzorků obsahovala navíc 62,5 nM cytochrom b₅.

Reakce byla startována přidáním 25 µl NADPH-generujícího systému, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5 µl fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE). Extrakce provedena dvakrát.

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha pod atmosférou dusíku. Vzorky byly uchovány při teplotě -20°C.

3.3.6. Kinetika oxidace ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy

Inkubační směsi o objemu 0,25 ml byly vždy připraveny ve třech paralelních vzorcích a obsahovaly:

- 200 nM cytochrom P450 (mikrosomy)
- 0,5-15 µM ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Reakce byla startována přidáním 25 µl NADPH-generujícího systému, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5 µl fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE). Extrakce provedena dvakrát.

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha pod atmosférou dusíku. Vzorky byly uchovány při teplotě -20°C.

3.3.7. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti NADPH a NADPH-generujícího systému

Inkubační směsi o objemu 0,25 ml byly vždy připraveny ve třech paralelních vzorcích a obsahovaly:

- 50 nM cytochrom P450 3A4 exprimovaný v SupersomechTM
- 10 μ M ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ . 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém) nebo 1 mM NADPH
- Polovina vzorků obsahovala navíc 62,5 nM cytochrom b_5 .

Reakce byla „startována“ 25 μ l NADPH-generujícího systému nebo NADPH, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5 μ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE). Extrakce provedena dvakrát.

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha proudem N_2 . Vzorky byly před další analýzou uchovávány při teplotě -20°C.

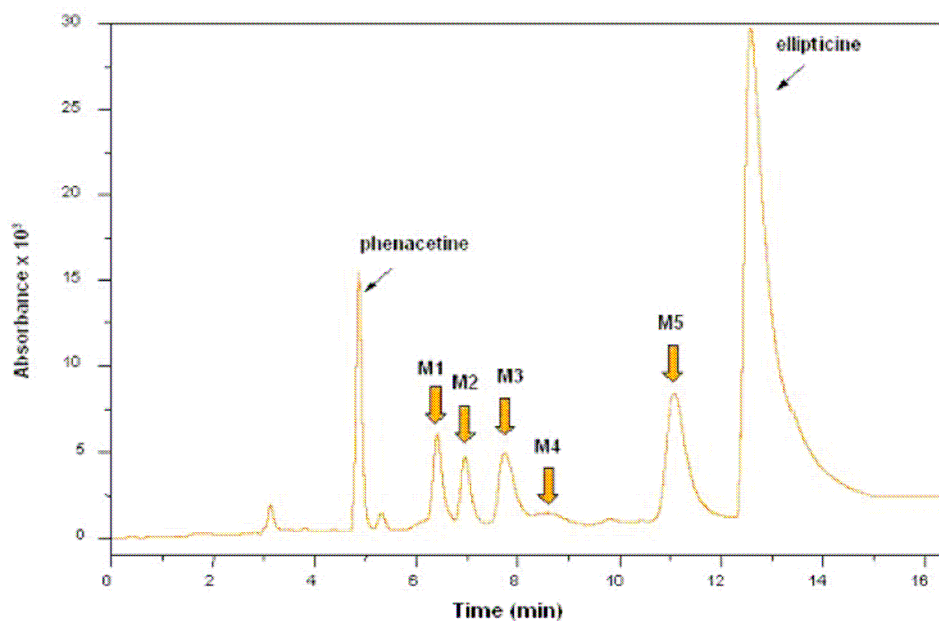
3.3.8. Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

Vzorky, obsahující jednotlivé metabolity ellipticinu, byly rozpuštěny ve 25 μ l methanolu a ellipticin a jeho metabolity byly separovány pomocí HPLC za použití mobilní fáze s 1-heptansulfonovou kyselinou (Tab.1.). Sonikací byly vždy před použitím z mobilní fáze odstraněny vzduchové bubliny. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Tabulka 1. Podmínky HPLC pro separování ellipticinu a jeho metabolitů

Mobilní fáze	64 % metanol, 5 mM heptansulfonát sodný, 32 mM kyselina octová
Kolona	Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Beckman)
Teplota kolony	37 °C
Průtok	0,7 ml/min
Nástřik	20 µl
Detekční délka	296 nm

Příklad separace ellipticinu a jeho metabolitů tvořených cytochromem P450 3A4 pomocí HPLC je uveden na Obr. 17.



Obrázek 17. HPLC ellipticinu a jeho metabolitů tvořených oxidací cytochromy P450. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5) [68].

4. Výsledky

4.1. Kinetika oxidace ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy

Pro studium kinetiky oxidace ellipticinu byly použity jak jaterní mikrosomy potkana premedikovaného Sudanem I a pregnenolon-karbonitrilem (PCN), tak i jaterní mikrosomy potkana nepremedikované (kontrolní mikrosomy). Pregnenolon-karbonitril je induktorem cytochromů P450 podrodiny 3A, Sudan I je pak zodpovědný za indukci cytochromů P450 podrodiny 1A [24]. Oxidací ellipticinu všemi testovanými potkaními jaterními mikrosomy vzniká jeho pět metabolitů (9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu) (Obr. 13.). Množství jednotlivých metabolitů se však liší v závislosti na použitém typu mikrosomů.

4.1.1. Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy izolovanými z nepremedikovaných potkanů (kontrolními mikrosomy)

Na základě kinetických studií bylo zjištěno, že jaterní mikrosomy potkana nepremedikovaného žádným z induktorů cytochromů P450 tvoří nejlépe 12-hydroxyellipticin (M2). Jeho množství bylo v tomto případě dokonce největší ze všech zkoumaných mikrosomálních systémů. Důvod nárůstu tvorby tohoto metabolitu ellipticinu oproti jeho tvorbě ostatními mikrosomy i oproti dalším metabolitům je dána s největší pravděpodobností vysokým zastoupením cytochromů P450 podrodiny 2C v tomto subcelulárním systému (až 55%) z celkového množství jaterních mikrosomů [37, 48]. Cytochromy P450 podrodiny 2C jsou totiž známy tím, že tento metabolit ochotně tvoří [68]. Kinetika tvorby všech pěti metabolitů ellipticinu vykazovala hyperbolickou závislost (Obr. 18. str. 41).

Hodnoty maximální rychlosti (V_{\max}), rychlostní konstanty (K_m) a čísla přeměny (k_{cat}) enzymové oxidace ellipticinu danými mikrosomy shrnuje *tabulka 2*.

Tabulka 2. Hodnoty maximální rychlosti (V_{max}), rychlostní konstanty (K_m) a čísla přeměny (k_{cat}) enzymové reakce katalyzované jaterními kontrolními mikrosomy.

	9-hydroxy- ellipticin (M1)	12-hydroxy- ellipticin (M2)	13-hydroxy- ellipticin (M3)	7-hydroxy- ellipticin (M4)	N2-oxid ellipticinu (M5)
V_{max} [nmol]	0,50	7,26	0,83	0,04	0,32
K_m [μ M]	7,00	33,32	2,98	4,43	36,33
k_{cat} [s^{-1}]	0,008	0,121	0,014	0,001	0,005

4.1.2. Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy potkana premedikovaného Sudanem I

Při studiu kinetiky oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných induktorem CYP1A, Sudanem I, byly kvantifikovány kinetické parametry jen čtyř metabolitů ellipticinu. Pátý metabolit, N²-oxid ellipticinu, měl totiž při použití elučního systému pro separaci ellipticinu a jeho metabolitů pomocí HPLC eluční čas velmi blízký elučnímu času ellipticinu. Z důvodu možných nepřesností proto nebyl kvantifikován. Použité mikrosomy oxidovaly ellipticin nejvýrazněji opět na 12-hydroxyellipticin (M2), jeho množství oproti ostatním metabolitům ellipticinu již ale není tak výrazné (tabulka č.3.). Překvapivě dochází ke snížení tvorby 9-hydroxyellipticinu (M1) oproti jeho tvorbě v kontrolních mikrosomech. Předpokládali jsem totiž, že „nabohacení“ mikrosomů cytochromy P450 1A, které přednostně oxidují ellipticin na 9-hydroxyellipticin, Sudanem I povede ke zvýšení oxidace ellipticinu právě na tento metabolit. Jedním z důvodů relativně nízké tvorby 9-hydroxyellipticinu oproti kontrolním mikrosomům může být pravděpodobně skutečnost, že „nabohacení“ mikrosomů cytochromy P450 1A indukcí Sudanem I nebylo efektivní. Navíc v prostředí jaterních mikrosomů, kde je přítomen i cyt b₅ je tvorba metabolitů 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu (M3) cytochromem b₅ pozměněna. Z posledních výsledků naší laboratoře totiž vyplývá, že jejich tvorba je zvýšena [35]. Kinetika oxidace ellipticinu opět vykazovala hyperbolický průběh (Obr. 19. str. 42).

Hodnoty maximální rychlosti (V_{max}), rychlostní konstanty (K_m) a čísla přeměny (k_{cat}) enzymové oxidace ellipticinu uvedenými mikrosomy jsou shrnuty v *tabulce 3*.

Tabulka 3. Hodnoty maximální rychlosti (V_{\max}), rychlostní konstanty (K_m) a čísla přeměny (k_{cat}) enzymové reakce katalyzované jaterními sudanovými mikrosomy.

	9-hydroxy- ellipticin (M1)	12-hydroxy- ellipticin (M2)	13-hydroxy- ellipticin (M3)	7-hydroxy- ellipticin (M4)
V_{\max} [nmol]	0,37	2,23	1,43	0,06
K_m [μM]	0,77	12,53	2,07	5,11
k_{cat} [s^{-1}]	0,006	0,037	0,024	0,001

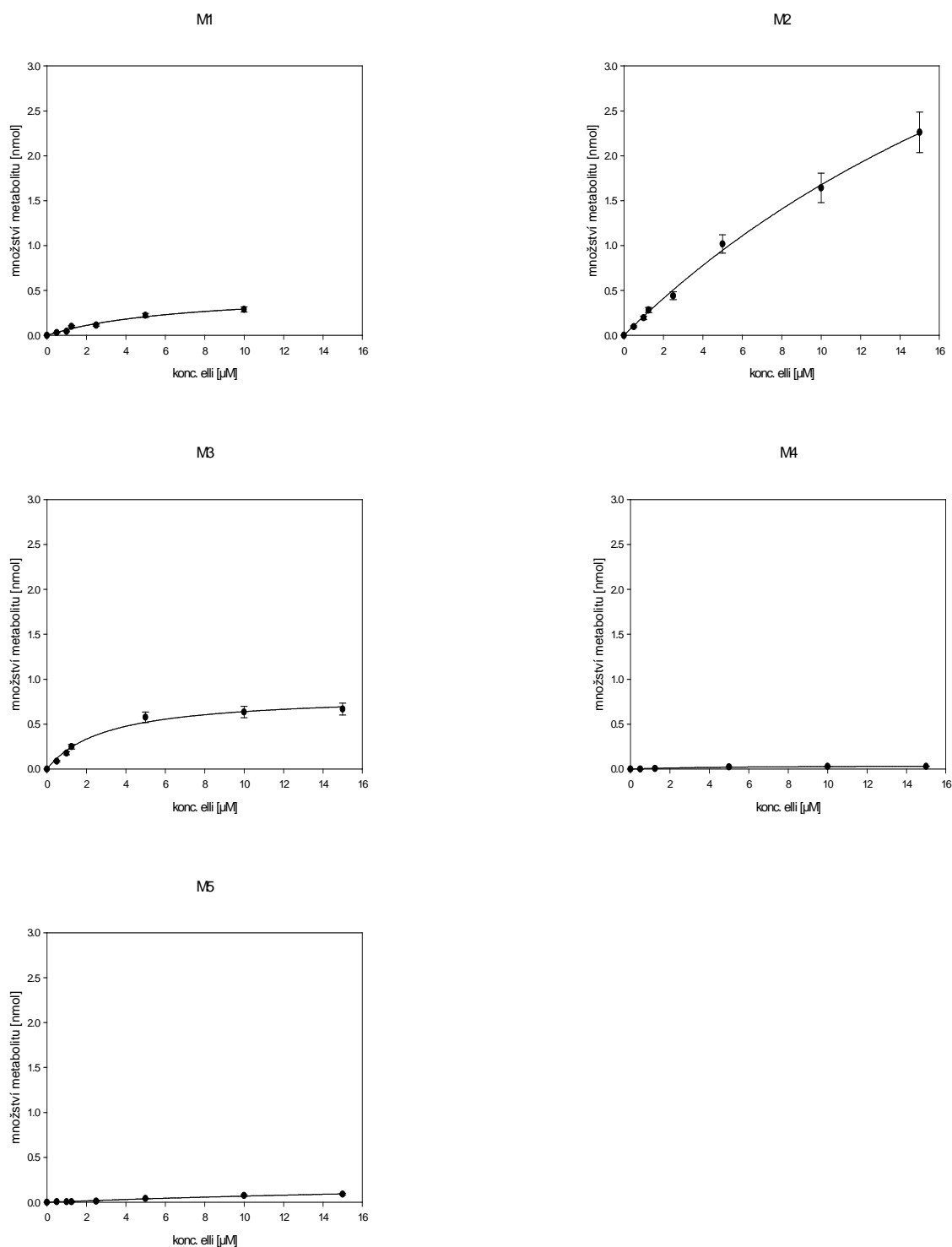
4.1.3. Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy potkana premedikovaného pregnenolon-karbonitrilem (PCN)

Za použití jaterních mikrosomů potkana indukovaného PCN dochází oproti reakcím v kontrolních mikrosomech k nárůstu oxidace ellipticinu na jeho pět metabolitů, s výjimkou výše diskutovaného 12-hydroxyellipticinu (M2). Také ve srovnání s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I je patrný nárůst tvorby všech ellipticinových metabolitů. Kinetika oxidace ellipticinu vykazuje hyperbolickou závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci ellipticinu, podobně jako v předchozích systémech (Obr. 20. str. 43).

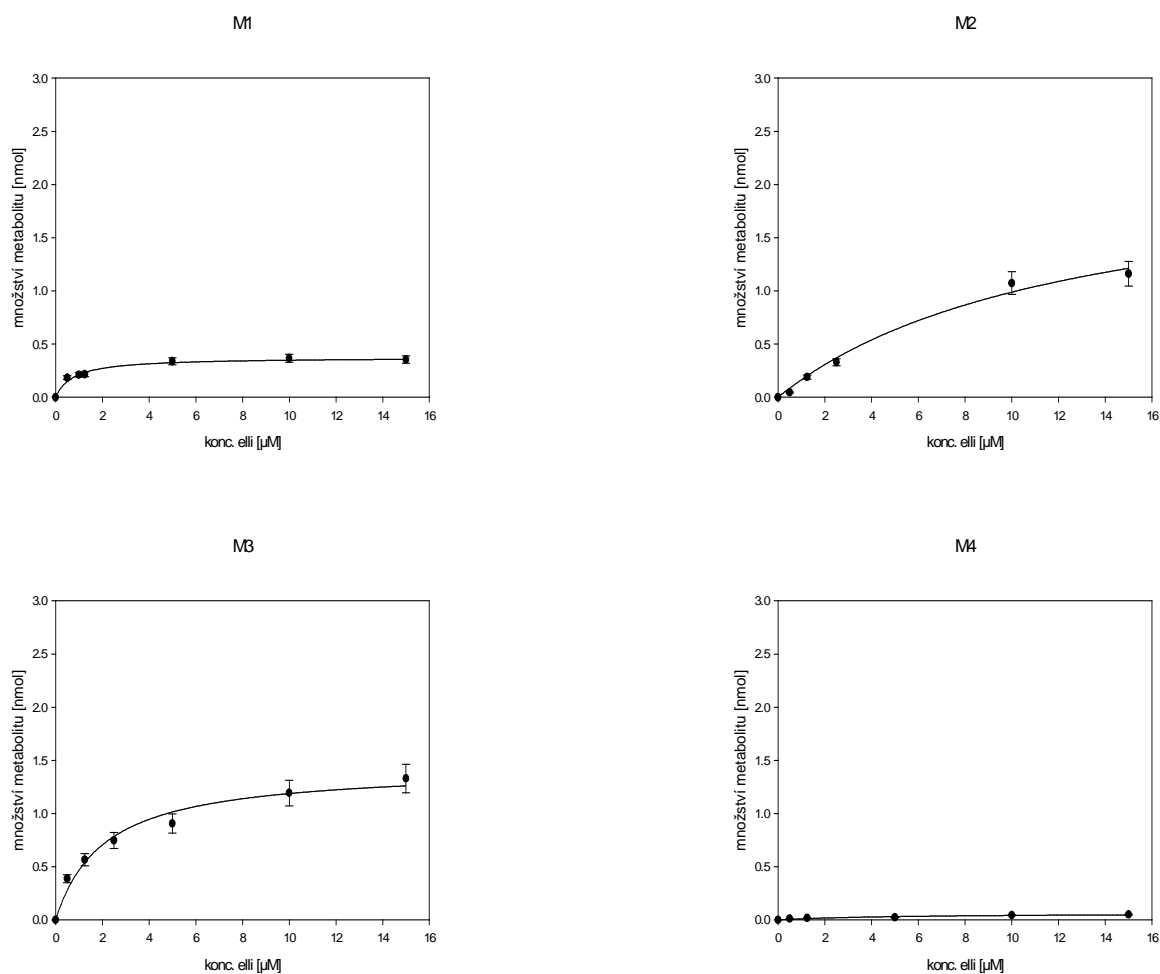
Hodnoty maximální rychlosti (V_{\max}), rychlostní konstanty (K_m) a čísla přeměny (k_{cat}) enzymové oxidace ellipticinu těmito mikrosomy shrnuje *tabulka 4*.

Tabulka 4. Hodnoty maximální rychlosti (V_{\max}), rychlostní konstanty (K_m) a čísla přeměny (k_{cat}) enzymové reakce katalyzované jaterními PCN mikrosomy.

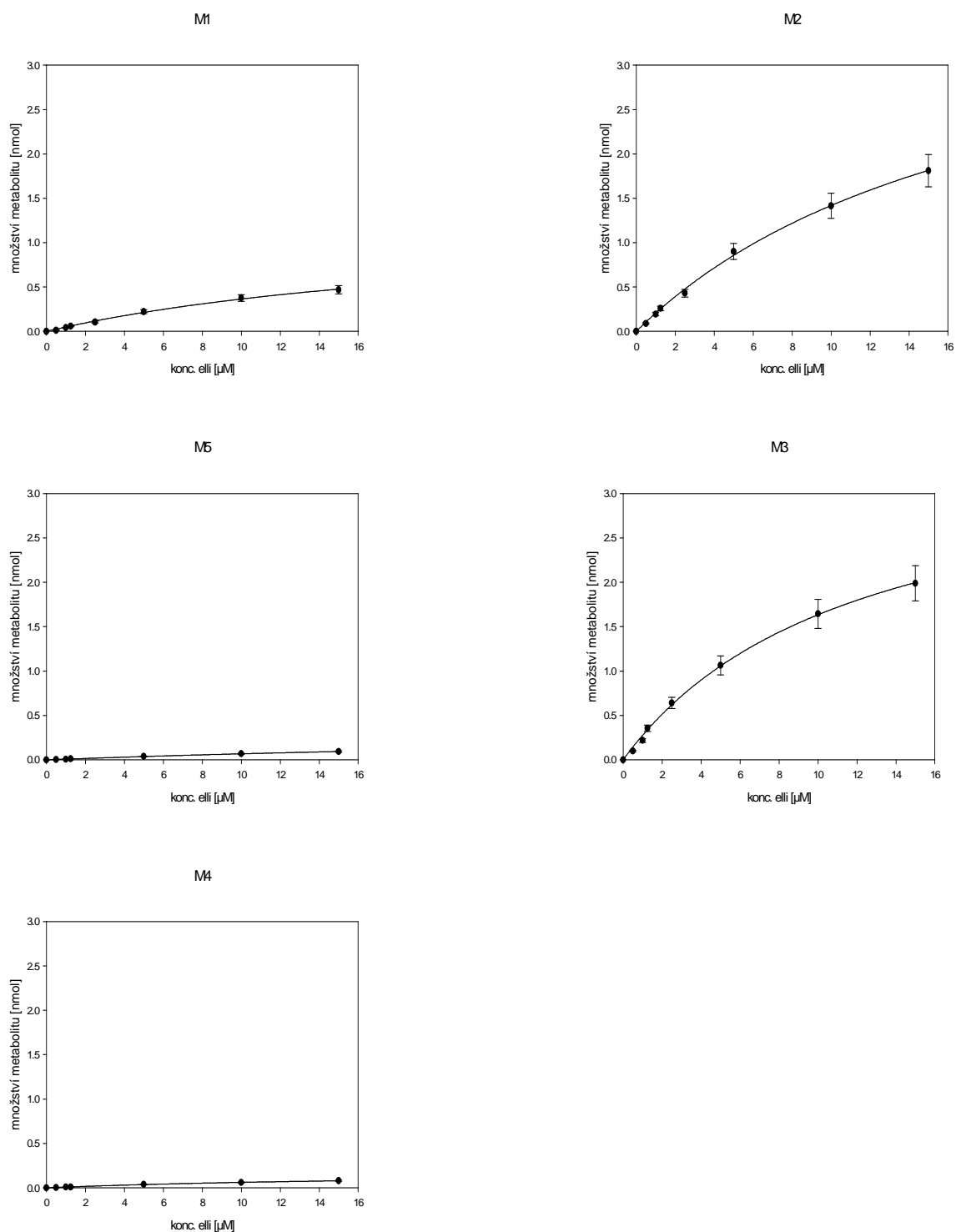
	9-hydroxy- ellipticin (M1)	12-hydroxy- ellipticin (M2)	13-hydroxy- ellipticin (M3)	7-hydroxy- ellipticin (M4)	N2-oxid ellipticinu (M5)
V_{\max} [nmol]	1,23	4,13	3,59	0,19	0,39
K_m [μM]	23,84	19,10	12,00	20,00	46,79
k_{cat} [s^{-1}]	0,021	0,069	0,060	0,003	0,007



Obrázek 18. Kinetika oxidace ellipticinu jaterními potkaními mikrosomy. A) kontrolní mikrotomy. Odchylka měření je 10%. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N^2 -oxid ellipticinu (M5)



Obrázek 19. Kinetika oxidace ellipticinu jaterními potkaními mikrotomy - mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I. Odchylka měření je 10%. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5)



Obrázek 20. Kinetika oxidace ellipticinu jaterními potkaními mikrotomy - mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. Odchylka měření je 10%. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5)

4.2. Porovnání enzymové aktivity lidských cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systému

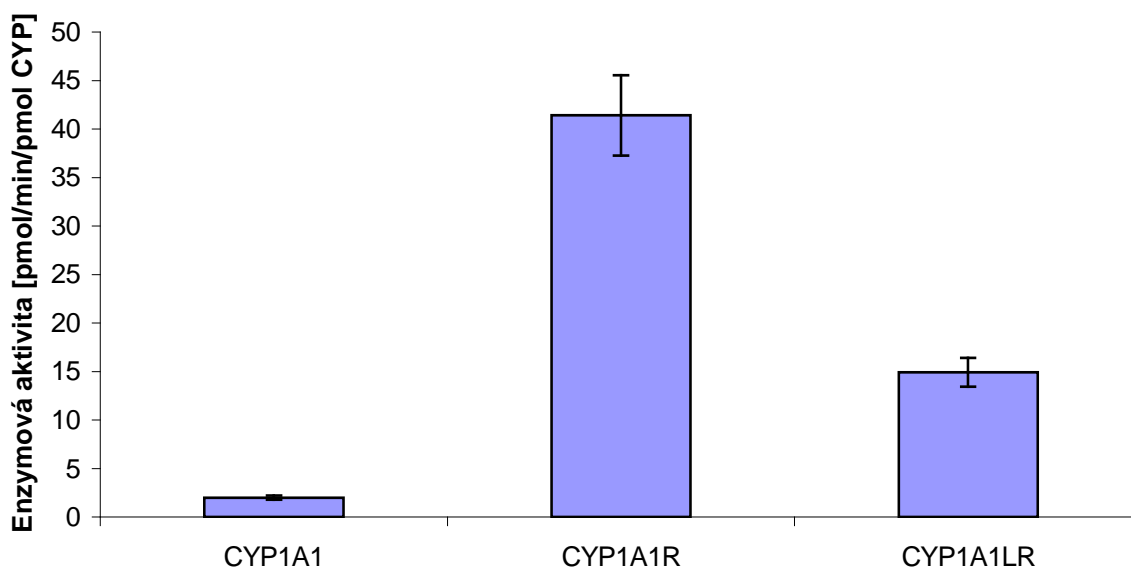
Jedním z klíčových cílů předkládané diplomové práce bylo porovnat aktivitu lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému. Jmenovitě, v SupersomechTM, mikrosomech izolovaných z hmyzích buněk transfekovaných *baculovirem*, nesoucím cDNA lidských CYP1A1, 1A2 a 3A4 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, nebo v Bactosomech, membránách *E. coli* transfekovaných cDNA stejných lidských CYP enzymů a NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Pro studium byly použity dva typy prokaryotních systémů, které se lišily v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Aktivita jednotlivých cytochromů P450 byla sledována za použití reakcí s tzv. markerovými substráty (*kapitola 3.3.3. a kapitola 3.3.4.*).

4.2.1. Deethylace 7-ethoxyresorufinu lidským cytochromem P450 1A1

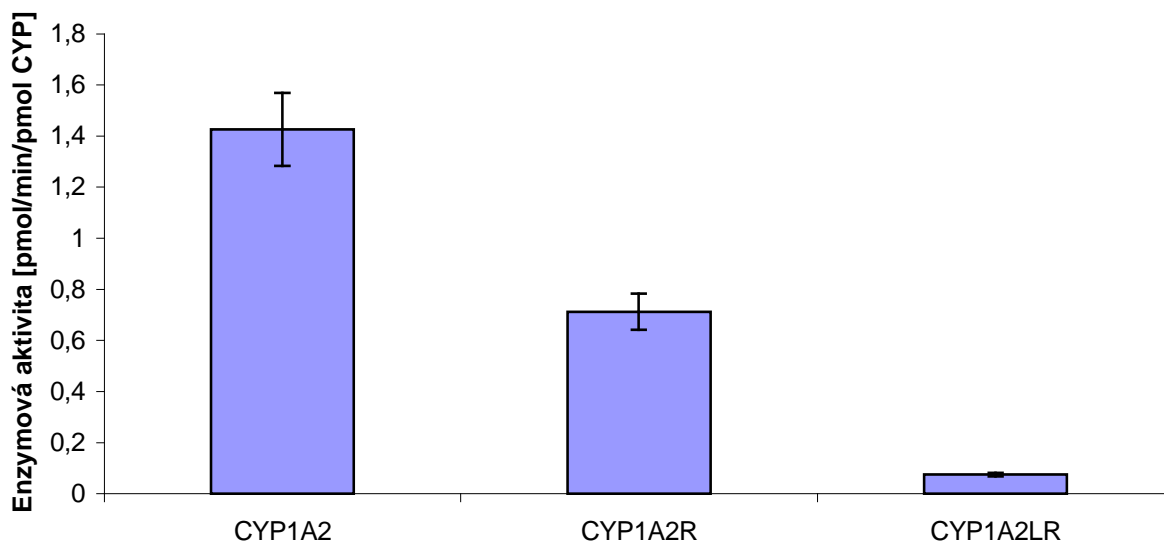
Cytochrom P450 1A1 je schopen deethylvat 7-ethoxyresorufin [44]. Tato reakce je pro něj typická a slouží tak jako tzv. reakce „markerová“. Jak je patrné z obr. 21. (str. 45), nejvyšší enzymovou aktivitu v této reakci vykazuje CYP1A1 exprimovaný do membrány *E. coli*. s vyšší expresí NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A1R). Prokaryotní systém s nižší expresí reduktasy (CYP1A1LR) vykazuje zhruba třetinovou aktivitu vůči tomuto substrátu (ethoxyresorufinu). Aktivita CYP1A1 exprimovaného v eukaryotním systému (CYP1A1) je oproti oběma prokaryotním systémům výrazně nižší.

4.2.2. Demethylace 7-methoxyresorufinu lidským cytochromem P450 1A2

Cytochrom P450 1A2 je vysoce efektivní v demethylaci 7-methoxyresorufinu [44], přičemž tato reakce se běžně označuje za reakci pro tento enzym „markerovou“. Nejvyšší enzymovou aktivitu vykazuje CYP1A2 exprimovaný v eukaryotním systému (CYP1A2). Tento enzym exprimovaný v *E. coli* s vyšší expresí NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A2R) má oproti eukaryotnímu expresnímu systému přibližně poloviční aktivitu. Aktivita CYP1A2 exprimovaná v *E. coli* s nižší expresí NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A2LR) je dokonce o řád nižší (Obr. 22.)



Obrázek 21. Srovnání aktivity lidského cytochromu P450 1A1 exprimovaného v membráně hmyzích buněk (CYP1A1) a v membráně *E.coli* (CYP1A1R a CYP1A1LR). Prokaryotní expresní systémy se lišily množstvím exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Data v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření.

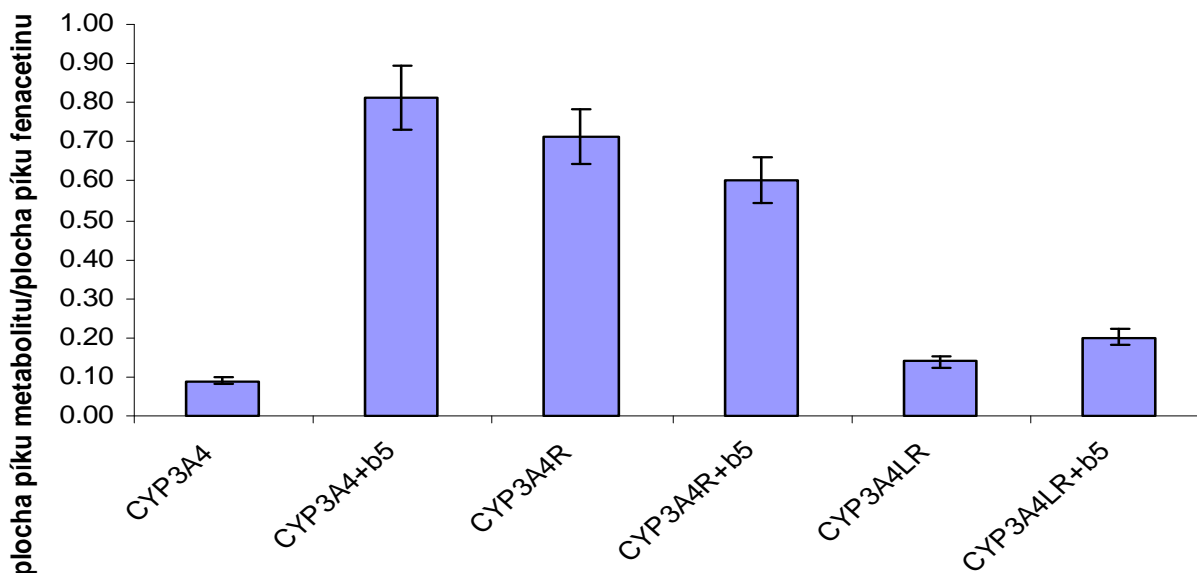


Obrázek 22. Srovnání aktivity lidského cytochromu P450 exprimovaného v membráně hmyzích buněk (CYP1A2) a v membráně *E. coli* (CYP1A2R a CYP1A2LR). Prokaryotní expresní systémy se lišily množstvím exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Výsledky v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření.

4.2.3. 6- β -hydroxylace testosteronu lidským cytochromem P450 3A4

„Markerovou“ reakcí lidského cytochromu P450 3A4 je 6- β -hydroxylace testosteronu [44]. Jak je patrné z obr. 23, cytochrom P450 3A4 exprimovaný v eukaryotním systému (CYP3A4) za přítomnosti cyt b_5 vykazuje výrazný rozdíl v 6- β -hydroxylaci testosteronu oproti systému bez tohoto proteinu. V přítomnosti cyt b_5 je tvorba 6- β -hydroxytestosteronu 9krát vyšší než bez tohoto proteinu. V případě CYP3A4 exprimovaného v prokaryotním systému je situace odlišná. V prokaryotním systému s nižší hodnotou NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP3A4LR) je tvorba tohoto metabolitu testosteronu stejně jako u CYP3A4 exprimovaného v eukaryotním systému vyšší za přítomnosti cyt b_5 . Tento nárůst je však pouze 1,4násobný. Druhý prokaryotní systém obsahující CYP3A4 a vysokou hladinu exprese NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP3A4R) ale vykazuje vyšší účinnost bez cyt b_5 . Prokaryotní systém s nižší hladinou exprimované reduktasy má bez cyt b_5 srovnatelnou enzymovou aktivitu s eukaryotním systémem bez cyt b_5 . Prokaryotní systém s vyšší expresí reduktasy má efektivitu v 6- β -hydroxylaci testosteronu srovnatelnou s aktivitou enzymu v eukaryotním systému v kombinaci s cyt b_5 .

Porovnání jednotlivých systému je na obrázku 23.



Obrázek 23. Srovnání aktivity lidského cytochromu P450 3A4 (s a bez cyt b_5) exprimovaného v membráně hmyzích buněk (CYP3A4) a v membráně *E. coli* (CYP3A4R a CYP3A4LR). Prokaryotní systémy se lišily v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření.

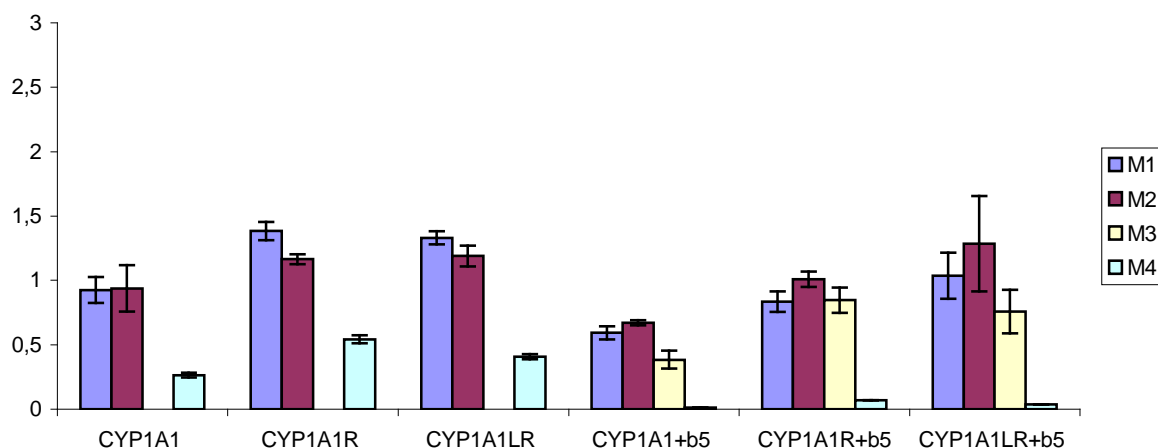
4.3. Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systému

V dalších experimentech byla sledována aktivita jednotlivých typů lidských cytochromů P450 exprimovaných v prokaryotním a eukaryotním systému vůči oxidaci ellipticinu. Tato aktivita byla sledována při různých koncentracích cytochromů P450. Dále byl zkoumán vliv cytochromu b_5 na tuto oxidaci. Cytochrom b_5 a cytochrom P450 byly navzájem v poměru 5:1. Vždy byl porovnáván jeden eukaryotní a dva prokaryotní systémy (*kapitola 3.3.5.*). Prokaryotní systémy se navzájem liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy.

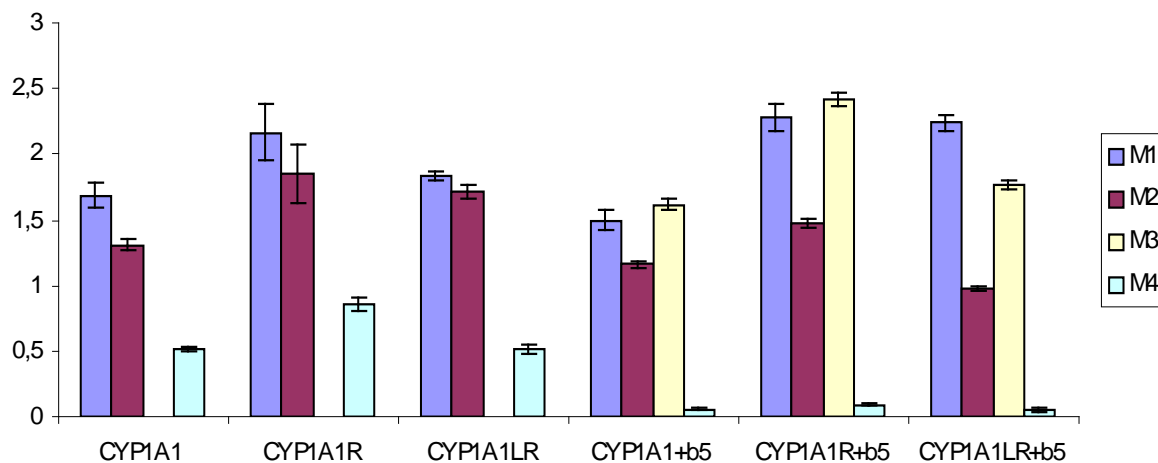
4.3.1. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1

Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) je schopen za přítomnosti cyt b_5 oxidovat ellipticin na všech pět jeho metabolitů (9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu). Bez tohoto proteinu cytochrom P450 1A1 přeměňuje ellipticin pouze na 4 metabolity, 13-hydroxyellipticin produkován není (Obr. 24.). Jako v předchozích experimentech nebyla tvorba N^2 -oxidu ellipticinu, vzhledem k možné nepřesnosti v jeho stanovení, vyhodnocována. CYP1A1 exprimovaný v obou typech prokaryotních systémů vykazoval bez cyt b_5 stejnou schopnost oxidace ellipticinu na jeho metabolity.

CYP1A1 se v obou systémech navíc jeví při této oxidaci účinnější než CYP1A1 exprimovaný v eukaryotním systému. Po přidání cyt b_5 dochází ke změně zastoupení metabolitů. 13-hydroxyellipticin (M3), jehož tvorba v systému bez cyt b_5 nebyla pozorována, vzniká v množství, které je srovnatelné s množstvím tvořeného 9-hydroxyellipticinu (M1). Po přidání cyt b_5 dochází ve všech zkoumaných systémech k poklesu tvorby všech metabolitů ellipticinu, s výjimkou 13-hydroxyellipticinu, a to v případě použití 50 nM koncentrace CYP1A1 v inkubačních směsích. Při koncentraci CYP1A1 100 nM k tomuto poklesu již nedochází s výjimkou 12-hydroxyellipticinu (Obr. 25.).



Obrázek 24. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v membráně hmyzích buněk (CYP1A1) a v membráně *E. coli* (CYP1A1R a CYP1A1LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4).

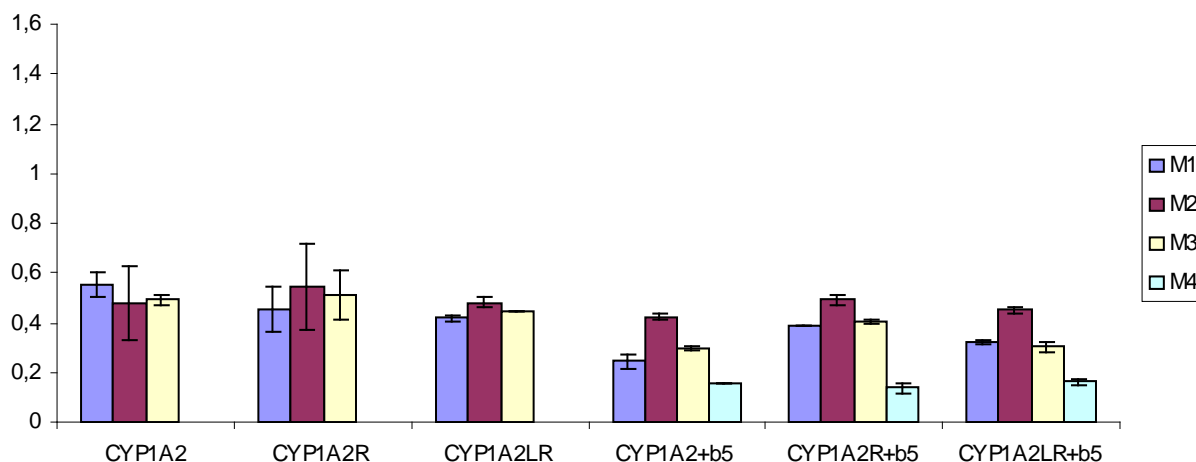


Obrázek 25. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v membráně hmyzích buněk (CYP1A1) a v membráně *E. coli* (CYP1A1R a CYP1A1LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 100 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4).

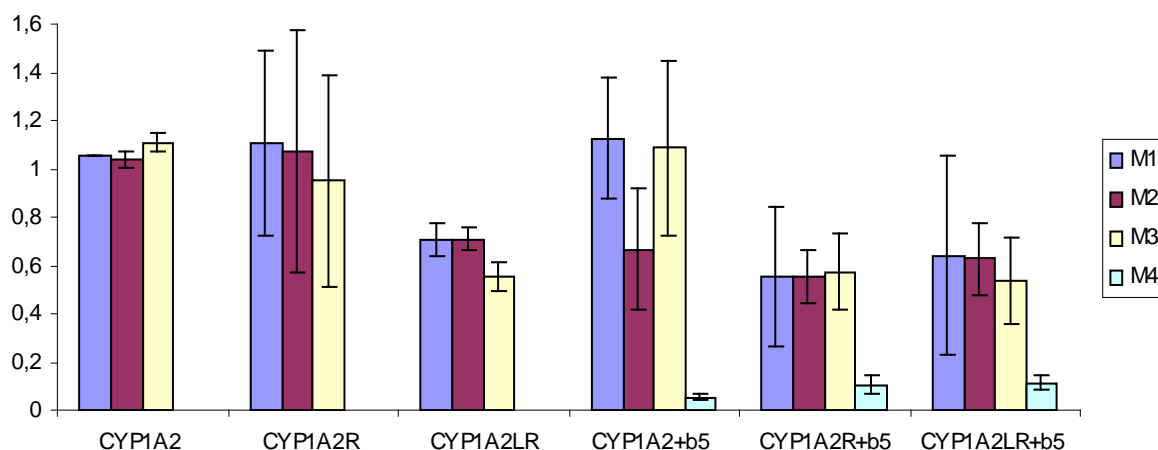
4.3.2. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2

Při oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A2 (CYP1A2) exprimovaném v eukaryotním a prokaryotním systému v koncentraci 50 nM dochází ke vzniku 9-hydroxy- (M1), 12-hydroxy- (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3) v množstvích, která se nijak výrazně nelišila mezi jednotlivými použitými systémy (Obr. 26.). Po přidání cyt b₅ do inkubační směsi byla pozorována i tvorba 7-hydroxyellipticinu (M4) (Obr. 26.). S výjimkou 12-hydroxyellipticinu dochází po přidání cyt b₅ k snížení tvorby ostatních metabolitů (M1, M3 a M4).

Při zvýšení koncentrace CYP1A2 na 100 nM v inkubační směsi dochází k tvorbě stejných metabolitů ellipticinu, ale jejich množství se oproti nižší koncentraci CYP1A2 zvyšuje, jak bylo očekáváno. V eukaryotním systému (CYP1A2) se po přidání cyt b₅ změnilo množství tvořeného 12-hydroxyellipticinu, jehož tvorba klesá. Prokaryotní systém (CYP1A2R) v kombinaci s cyt b₅ oxiduje ellipticin na jednotlivé metabolity ve srovnatelných množstvích. Tato množství jsou ale zhruba jen poloviční ve srovnání s množstvím těchto metabolitů tvořených CYP1A2 z ellipticinu bez cyt b₅. Druhý prokaryotní systém s nižším obsahem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A2LR) vykazuje přibližně stejnou efektivitu oxidovat ellipticin na jednotlivé metabolity, bez ohledu na přítomnost cyt b₅. Jediný rozdíl je ve tvorbě 7-hydroxyellipticinu (Obr. 27.), jehož tvorba nebyla bez cyt b₅ pozorována.



Obrázek 26. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2 exprimovaným v membráně hmyzích buněk (CYP1A2) a v membráně *E. coli* (CYP1A2R a CYP1A2LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4).

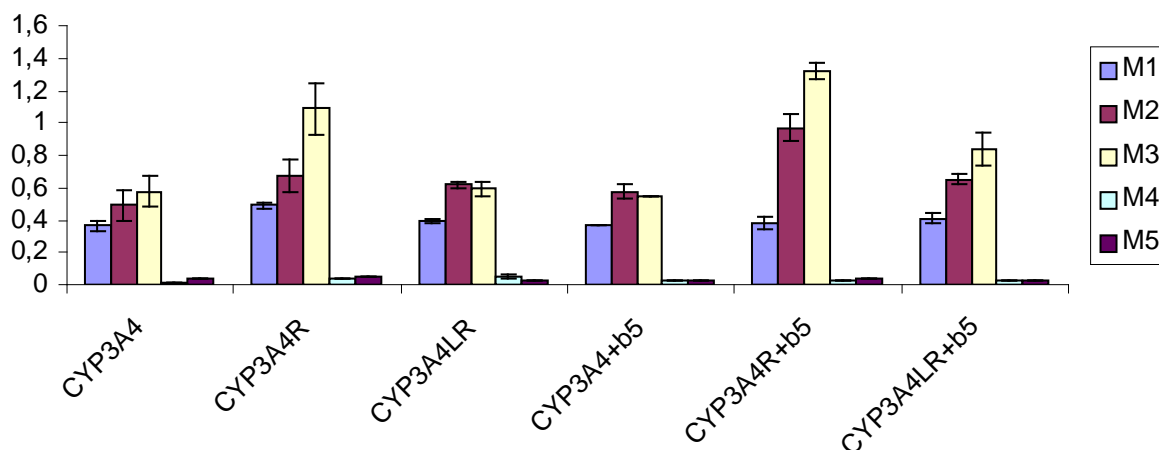


Obrázek 27. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2 exprimovaným v membráně hmyzích buněk (CYP1A2) a v membráně *E. coli* (CYP1A2R CYP1A2LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 100 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4).

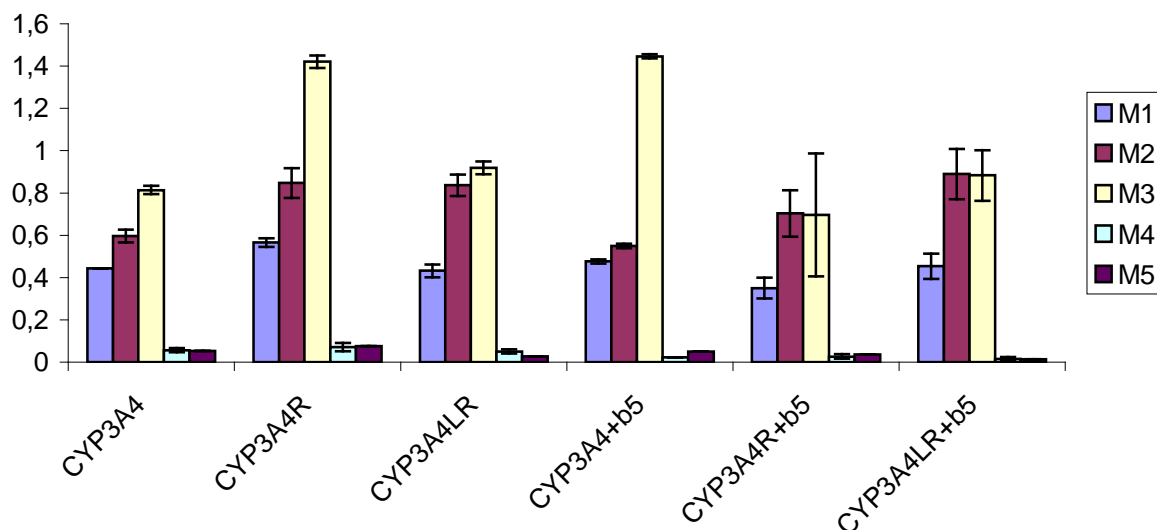
4.3.3. Oxidace elliptycinu lidským cytochromem P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 exprimovaný jak v eukaryotním, tak i prokaryotním systému oxiduje ellipticin za tvorby pěti metabolitů: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyelliptycinu a N²-oxidu elliptycinu. Při 50 nM koncentraci cytochromu P450 3A4 je tento enzym v obou prokaryotních systémech (CYP3A4R a CYP3A4LR) v oxidaci elliptycinu účinnější než CYP3A4 exprimovaný v systému eukaryotním (CYP3A4) (Obr. 28.). Přítomnost cyt b₅ v systému CYP3A4 exprimovaného v prokaryotních systémech stimuluje tvorbu 12-hydroxy- a 13-hydroxyelliptycinu (M2 a M3). Přítomnost tohoto proteinu v systému CYP3A4 (50 nM) exprimovaného v eukaryotním systému oxidaci elliptycinu neovlivňuje.

Z obrázku 29. (str. 52) je patrné, že CYP3A4 za koncentrace 100 nM exprimovaný v prokaryotním systému s nižším obsahem reduktasy (CP3A4LR) není přítomností cyt b₅ ovlivňován. CYP3A4 za této koncentrace (100 nM) v druhém prokaryotním systému (CYP3A4R) v přítomnosti tohoto proteinu vykazuje sníženou efektivitu oxidovat ellipticin. CYP3A4 v eukaryotním systému (CYP3A4) v přítomnosti cyt b₅ efektivněji tvoří 13-hydroxyellipticin, zatímco oxidace elliptycinu na další metabolity zůstává prakticky beze změny.



Obrázek 28. Oxidace elliptycinu lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaným v membráně hmyzích buněk (CYP3A4) a v membráně *E. coli* (CYP3A4R a CYP3A4LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid elliptycinu (M5)



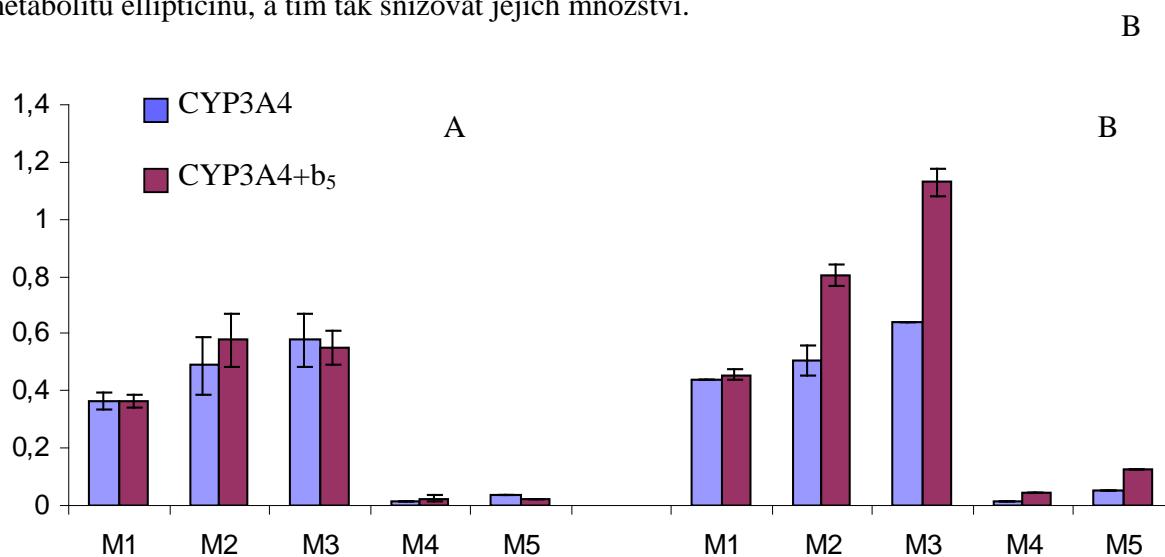
Obrázek 29. Porovnání oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaným v membráně hmyzích buněk (CYP3A4) a v membráně *E. coli* (CYP3A4R a CYP3A4LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 100 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5)

4.4. Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti NADPH nebo NADPH-generujícího systému

V dalších experimentech jsme sledovali vliv NADPH, kofaktoru MFO systému (NADPH:cytochrom P450 reduktasy), jako chemické sloučeniny, přidané do systému cytochromu P450 3A4 a jeho reduktasy (NADPH:cytochrom P450 reduktasa), a této sloučeniny, přímo tvořené NADPH-generujícím systémem ve výše uvedeném enzymovém systému. Zkoumán byl jeho vliv na oxidaci ellipticinu jako substrátu cytochromu P450 3A4 exprimovaném v eukaryotním systému (SupersomyTM). Dále byl porovnáván vliv cytochromu b₅ (cyt b₅) na tuto oxidaci danými enzymovými systémy. Důvodem tohoto experimentu byla skutečnost, že v našich pokusech pracujeme s NADPH-generujícím systémem a chtěli jsme si tudíž potvrdit, že přítomností sloučenin tvořících generující systém nevzniká oxidací ellipticinu žádný metabolit, jenž by nevznikal se samotným NADPH.

V případě cytochromu P450 3A4 bez cyt b_5 jsou množství všech pěti produkovaných metabolitů ellipticinu jak v systému obsahujícím NADPH, tak i v systému obsahujícím NADPH-generující systém prakticky stejná (Obr. 30 str. 53). Za přítomnosti cyt b_5 v systému s NADPH oproti systému obsahujícím NADPH-generující systém však dochází ke zvýšení produkce 12-hydroxy, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu. Tento nárůst je nejvíce patrný pro N^2 -oxid ellipticinu (M5), u něhož je více jak dvojnásobný. Jeho eluční čas je ale velmi blízký elučnímu času samotného ellipticinu, a tak je třeba získané výsledky interpretovat pouze velmi opatrně. V důsledku tohoto rozdílu v produkci metabolitů ellipticinu se také liší poměry zastoupení jednotlivých metabolitů tvořených cytochromem P450 3A4 za přítomnosti cyt b_5 a jeho nepřítomnosti mezi systémy obsahujícími NADPH nebo NADPH-generující systém (Obr. 30. a 31.).

Rozdíly v tvorbě jednotlivých metabolitů ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti NADPH a NADPH-generujícího systému mohou být dány tím, že protein glukosa-6-fosfátdehydrogenasy přítomný v reakčním médiu může sloužit jako „scavenger“ reaktivních metabolitů ellipticinu, a tím tak snižovat jejich množství.

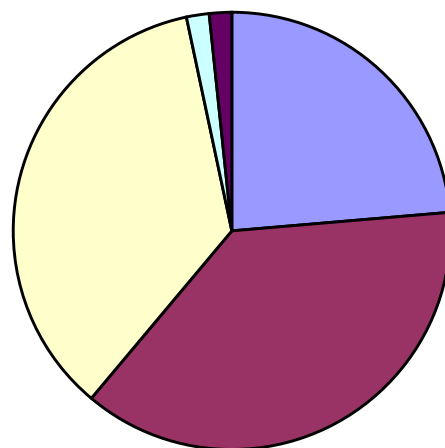
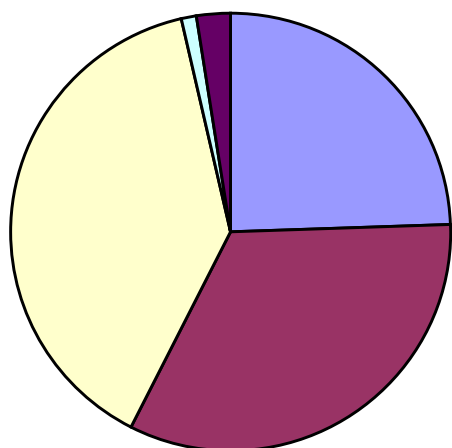


Obrázek 30. Vliv NADPH a NADPH-generujícího systému na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 za přítomnosti cytochromu b_5 a bez tohoto proteinu. Reakce byly iniciovány A) NADPH generujícím systémem a B) NADPH. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N^2 -oxid ellipticinu (M5)

CYP3A4

A

CYP3A4+b₅

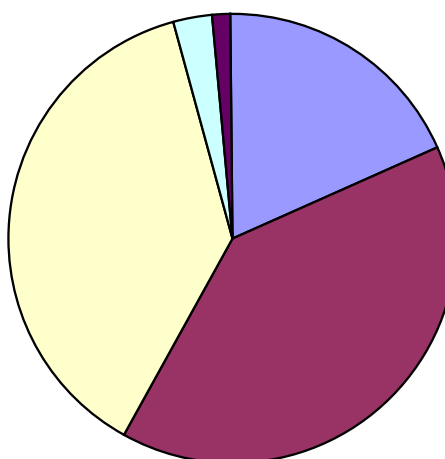
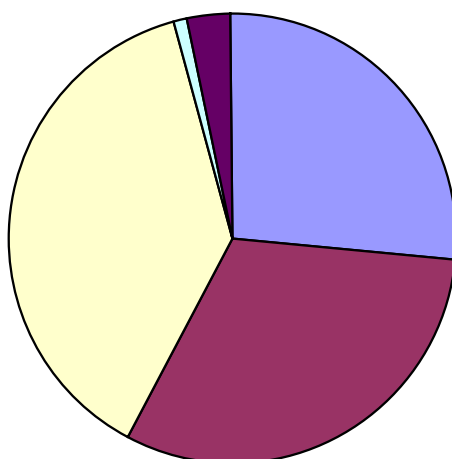


■ M1 ■ M3 ■ M5
■ M2 ■ M4

CYP3A4

B

CYP3A4+b₅



Obrázek 31. Tvorba jednotlivých metabolitů ellipticinu tvořených CYP3A4 s cyt b₅ a bez tohoto proteinu iniciovaná A) NADPH-generujícím systémem a B) NADPH. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5)

5. Diskuse

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin [36, 38, 60]. Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií se do současnosti vyvinulo velké množství genů kódujících cytochromy P450 organismů [60]. Systém cytochromu P450 je u eukaryot vázán na membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního α -helixu [10]. Bakteriální cytochromy P450 jsou rozpustné enzymy.

Pro studium substrátové specifity lidských cytochromů P450 je nutné pracovat s enzymovými preparáty jejich jednotlivých zástupců. Izolace lidských cytochromů P450 a jejich rekonstituce s NADPH:cytochrom P450 reduktasou v systémech simulujících prostředí membrány endoplasmatického retikula jsou experimentálně velmi obtížné. Řada laboratoří se proto začala zabývat přípravou lidských rekombinantních enzymů. Pro přípravu lidských cytochromů P450 bylo dosud vyvinuto několik modelů. Lidské cytochromy P450 je možné exprimovat v několika typech buněk. Běžná je exprese v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem*, savčích buňkách, kvasinkách a bakteriích (nejčastěji v *E.coli*). Každý z těchto expresních systémů má své výhody i nevýhody. Při expresi v prokaryotních organismech je dosahováno vysoké hladiny exprese jednotlivých cytochromů P450, nedostatkem ale je absence membránových útvarů v buňce, na které se dané cytochromy P450 normálně váží, a také nutnost „koexprese“ NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Při expresi v savčích buňkách je hlavním nedostatkem nízká exprese. V hmyzích buňkách je dobrá exprese jednotlivých cytochromů P450, nedostatkem ale je nutnost koexprese NADPH:cytochrom P450 reduktasy [50].

V rámci diplomové práce bylo sledováno ovlivnění aktivit lidských cytochromů P450 jejich expresí v rozdílných buněčných systémech. Konkrétně v eukaryotickém systému, v SupersomechTM, kde se jedná o mikrosomy hmyzích buněk transfekovaných *baculovirem*, obsahujícím cDNA lidských CYP1A1, 1A2 a 3A4 a lidské NADPH-cytochrom P450 reduktasy, a dále pak v systému prokaryotickém, v Bactosomech. Zde se jedná o membrány buněk *E. coli* transfekovaných cDNA stejných lidských enzymů. Studovány byly dva prokaryotní expresní systémy, které se vzájemně lišily v množství exprimované NADPH-cytochrome P450 reduktasy. Aktivita všech enzymů byla sledována vůči „markerovým“ substrátům jednotlivých cytochromů a také vůči oxidaci ellipticinu.

Dále byla rovněž sledována kinetika oxidace ellipticinu přirozenými systémy obsahujícími cytochromy P450, jmenovitě jaterními potkaními mikrosomy. Konkrétně mikrosomy obsahujícími různá množství jednotlivých cytochromů P450, v závislosti na indukci těchto enzymů.

Efektivita lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému v oxidaci „markerových“ substrátů

Při studiu lidských cytochromů P450 exprimovaných jednak v SupersomechTM, což jsou mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných *baculovirem* (eukaryotní systém) a jednak v Bactosomech, což jsou membrány buněk *E. coli*. (prokaryotní systém) byla nejprve sledována jejich enzymová aktivita vůči jejich „markerovým“ substrátům. V experimentech byly využívány jeden systém eukaryotní a dva prokaryotní systémy. Oba prokaryotní systémy se lišily v množství exprimované NADPH:cytochrom P450 reduktasy.

Jednotlivé testované systémy se v efektivitě oxidovat substráty lišily. Cytochrom P450 1A1 exprimovaný do membrány buněk *E. coli* (prokaryotní systém) vykazoval vyšší aktivitu pro svou „markerovou“ reakci (EROD). V případě cytochromu P450 1A2 byla situace právě opačná. Vyšší aktivitu tohoto enzymu, měřenou jako demethylaci methoxyresorufinu, jsme pozorovali v eukaryotním expresním systému. U třetího zkoumaného lidského cytochromu P450, CYP3A4, závisela aktivita jednotlivých systémů na přítomnosti cytochromu b₅. Bez tohoto proteinu byla aktivita CYP3A4 vyšší v prokaryotních systémech. Naopak cytochrom b₅ potencoval účinek CYP3A4 exprimovaného v eukaryotním systému. Při srovnání dvou prokaryotních expresních systémů, obsahujících jednotlivé isoformy cytochromů P450, byl vždy účinnější ten, který obsahoval vyšší hladiny NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Tuto skutečnost lze přičíst faktu, že pro funkci cytochromu P450 je absolutně nezbytná interakce s NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Bez této reduktasy nejsou cytochromy P450 schopny fungovat jako terminální oxidasa MFO systému a provádět oxidaci svých substrátů. Při její nižší expresi se tudíž nemusí k cytochromům P450 dostávat potřebné množství elektronů, a dochází tak k nižší aktivaci kyslíku, nutné pro zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu.

Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systémech

Dalším krokem při studiu účinnosti lidských cytochromů P450 exprimovaných jednak v SupersomechTM a jednak v Bactosomech bylo porovnání jejich schopnosti oxidovat ellipticin. Ellipticin je testovanými lidskými cytochromy P450 přeměňován za vzniku až pěti metabolitů, 9-hydroxy, 12-hydroxy, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu [56, 58].

Všechny tři testované cytochromy P450, konkrétně CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4, tvořily stejné metabolity bez ohledu na to, zda byly exprimovány v eukaryotním nebo prokaryotním systému. V případě cytochromu P450 1A1 vykazoval tento enzym větší schopnost oxidovat ellipticin, byl-li exprimován v prokaryotních systémech, a to jak za přítomnosti tak i nepřítomnosti cyt b₅. Přítomnost tohoto proteinu navíc stimulovala tvorbu 13-hydroxyellipticinu cytochromem P450 1A1, jehož tvorba bez cyt b₅ nebyla pozorována. Cytochrom P450 3A4 byl také účinnější v oxidaci ellipticinu byl-li exprimován v prokaryotních expresních systémech. V případě cytochromu P450 1A2 jeho efektivita oxidovat ellipticin prakticky nezávisela na tom, ve kterém systému byl exprimován. Ať byl tento enzym exprimován v prokaryotním nebo eukaryotním systému, oxidoval ellipticin v obdobném rozsahu. Bez cytochromu b₅ vykazovaly všechny testované prokaryotní expresní systémy s vyšší expresí NADPH:cytochrom P450 reduktasy vyšší schopnost oxidovat ellipticin než prokaryotní systémy s nižší expresí dané reduktasy.

Z námi získaných výsledků je tedy patrné, že pro testování efektivit jednotlivých cytochromů P450 vůči oxidaci jejich substrátů nelze užít vždy pouze jeden systém. Z výsledků vyplývá, že nelze plně rozhodnout, zda jsou vhodnějšími modely pro studium oxidace xenobiotik cytochromy P450 exprimované v prokaryotních nebo eukaryotních expresních systémech.

Oxidace ellipticinu CYP3A4 za přítomnosti NADPH nebo NADPH-generujícího systému

Dalším problémem, který může komplikovat výběr vhodného systému cytochromů P450 pro oxidaci xenobiotik je použití formy donoru elektronů v MFO systému, koenzymu NADPH:cytochrom P450 reduktasy, NADPH. V další fázi výzkumu byl tedy studován vliv NADPH jako samotné chemické sloučeniny a této sloučeniny generované NADPH-generujícím systémem (kde je obsažena glukosa-6-fosfátdehydrogenasa) přímo v inkubacích, a to na oxidaci

ellipticinu cytochromem P450 3A4. Důvodem je skutečnost, že některé metabolity xenobiotik mohou být ovlivněny nukleofily přítomnými v NADPH-generujícím systému (jako je např. protein přítomného enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy). Pro dokreslení tohoto studia byl dále zkoumán vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu v tomto prostředí.

CYP3A4 je v přítomnosti obou testovaných systémů (NADPH nebo NADPH-generující systém) schopen oxidovat ellipticin za tvorby jeho pěti metabolitů. Účinnější schopnost oxidace ellipticinu vykazuje NADPH jako chemická sloučenina. Tuto skutečnost lze pravděpodobně přičíst faktu, že v NADPH-generujícím systému může glukosa-6-fosfátdehydrogenasa přítomná v inkubačních směsích sloužit jako „scavenger“ reaktivních forem ellipticinu, a tím snižovat jejich množství. Další možností je skutečnost, že látky obsažené v inkubačních směsích mohou nepříznivě interagovat s glukosa-6-fosfátdehydrogenasou, a tím snižovat její aktivitu při tvorbě NADPH.

Přítomnost cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu měla vliv v obou testovaných systémech, a to na všech pět vznikajících metabolitů ellipticinu. V systému s NADPH jako chemickou sloučeninou docházelo k stimulaci tvorby čtyř metabolitů (12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxy-ellipticinu a N²-oxidu ellipticinu). V případě NADPH-generujícího systému dochází k stimulaci tvorby 12-hydroxy- (M2) a 7-hydroxyellipticinu (M4). Metabolity 13-hydroxyellipticin (M3) a N²-oxid ellipticinu (M5) jsou v přítomnosti cyt. b₅ tvořeny méně efektivně než bez tohoto proteinu.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že jak NADPH, tak NADPH-generující systém, přítomné v inkubačních směsích s CYP3A4 participují na tvorbě stejných metabolitů a v nepřítomnosti cyt b₅, vznikají tyto metabolity ve srovnatelných množstvích. Přidání tohoto proteinu výrazně zvýší množství 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu v systému obsahujícím NADPH. To nasvědčuje skutečnosti, že v přítomnosti cyt b₅ jsou vznikající větší množství reaktivních forem ellipticinu, náchylných k reakcím s proteinovými složkami NADPH-generujícího systému (glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), tímto enzymem „vychytávány“. Při použití NADPH-generujícího systému v kombinaci s cyt b₅ tedy musíme počítat s relativním úbytkem daných metabolitů (12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu), obecně pak reaktivních metabolitů dalších substrátů cytochromů P450.

Kinetika oxidace ellipticinu jaterními potkaními mikrosomy

Ke studiu kinetiky oxidace ellipticinu jaterními potkaními mikrosomy byly použity mikrosomy z jater potkanů premedikovaných jednak pregnenolonkarbonitrilem (PCN), jednak Sudanem I a také jaterní mikrosomy nepremedikovaných potkanů. Vybrány byly tyto mikrosomy, protože ellipticin je všemi uvedenými mikrosomy oxidován až na jeho pět metabolitů (9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu).

Kinetika tvorby všech metabolitů ellipticinu cytochromy P450 v mikrosomech vykazovala hyperbolickou závislost počáteční rychlosti na koncentraci ellipticinu. Mikrosomy z nepremedikovaného potkana vykazovaly nejvyšší schopnost oxidovat ellipticin za vzniku 12-hydroxyellipticinu. Tvorba tohoto metabolitu výrazně převyšovala tvorbu dalších metabolitů (7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu) a i ve srovnání s dalšími typy mikrosomů byla nejvyšší. Důvodem může být přítomnost cytochromů P450 podrodiny 2C, které jsou v potkaních játrech exprimované v majoritním množství [37, 48]. Tyto enzymy jsou navíc v oxidaci ellipticinu na 12-hydroxyellipticin vysoce efektivní [68]. Také další typy mikrosomů tvořily přednostně 12-hydroxyellipticin, jeho množství oproti ostatním metabolitům již ale nebylo tak významné. Mikrosomy z jater potkana premedikovaného Sudanem I (induktor cytochromů P450 podrodiny 1A [44]) netvořily přednostně 9-hydroxyellipticin, jehož tvorba by se dala očekávat, vzhledem k tomu, že je, jak již bylo dříve zjištěno, tvořen jako hlavní metabolit cytochromy P450 podrodiny 1A [56, 58]. V těchto mikrosomech převažovala tvorba 12- a 13-hydroxyellipticinu. Tuto skutečnost lze vysvětlit např. méně efektivní indukcí požadované podrodiny cytochromu P450 (CYP1A) nebo přítomností dalších složek mikrosomálního systému.

Jaterní mikrosomy potkana premedikovaného PCN (induktor podrodiny cytochromů P450 3A) se jeví jako nejúčinnější při oxidaci ellipticinu na jednotlivé metabolity s výjimkou dříve diskutovaného 12-hydroxyellipticinu. Z dřívějších studií je známo, že cytochromy P450 podrodiny 3A přednostně tvoří 13-hydroxyellipticin [56, 58]. Množství tohoto metabolitu ellipticinu tvořeného v „PCN“ mikrosomech bylo oproti jeho tvorbě v kontrolních mikrosomech čtyřnásobně vyšší. Tyto skutečnosti svědčí o indukci cytochromů P450 právě této podrodiny.

Z výsledků této části diplomové práce vyplývá, že při účinné indukci jednotlivých podrodin cytochromů P450 se jaterní mikrosomy jeví jako vhodný model pro studium aktivity jednotlivých forem cytochromů P450, alespoň v případě oxidace studovaného substrátu cytochromů P450 - ellipticinu.

6. Závěr

Z výsledků diplomové práce vyplývají následující závěry:

- Při porovnávání aktivit jednotlivých forem cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4) exprimovaných jednak v systému eukaryotickém (do membrán endoplasmatického retikula hmyzích buněk) a jednak v systému prokaryotickém (membrány buněk *E. coli*) vůči jejich „markerovým“ substrátům (methoxyresorufin, ethoxyresorufin a testosteron) bylo zjištěno, že CYP1A1 je účinnější, je-li exprimován v prokaryotních systémech. Naopak CYP1A2 byl v oxidaci „markerového“ substrátu (methoxyresorufinu) účinnější, byl-li exprimován v eukaryotním systému. Aktivita CYP3A4 se značně liší v závislosti na přítomnosti cyt b₅. Bez tohoto proteinu vykazují vyšší aktivitu CYP3A4 v 6-β-hydroxylaci testosteronu prokaryotní systémy. V přítomnosti cyt b₅ se ale stává účinnějším eukaryotní expresní systém. Prokaryotní systém s vyšší expresí NADPH:cytochrom P450 reduktasy byl přitom vždy účinnější než druhý prokaryotní systém s nižší hladinou tohoto enzymu.
- Při oxidaci ellipticinu tvořily lidské cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimované v *E. coli* (prokaryotní systém) stejné metabolity jako tyto cytochromy P450 exprimované do membrány hmyzích buněk (eukaryotní systém). Při nižší koncentraci cytochromů P450 (50 nM) se v případě všech zkoumaných forem cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1A2 s CYP3A4) jeví jejich přítomnost v prokaryotních systémech při této oxidaci účinnější, a to jak v přítomnosti cyt b₅ tak v jeho nepřítomnosti. Při vyšší koncentraci cytochromů P450 (100 nM) je situace složitější. CYP1A1 je opět v oxidaci ellipticinu účinnější, je-li v prokaryotním systému, a to bez ohledu na přítomnost cyt b₅. CYP1A2 je v případě přítomnosti cyt b₅ účinnější v oxidaci ellipticinu, je-li v eukaryotním systému. Bez tohoto proteinu se eukaryotní a prokaryotní systém s vyšší expresí reduktasy nijak zásadně neliší. CYP3A4 bez cyt b₅ účinněji oxiduje ellipticin, jestliže je exprimován v membránách buněk *E. coli*.

- Cytochrom P450 3A4 v přítomnosti jak NADPH tak NADPH-generujícího systému oxiduje ellipticin na pět jeho metabolitů (9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu). Použití NADPH v inkubacích se jeví jako výhodnější. Přítomnost proteinu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy totiž může způsobovat interakci reaktivních elektrofilních metabolitů ellipticinu, a tak snížit jejich měřenou hodnotu. Přítomnost cyt b₅ v inkubačním systému ovlivňuje tvorbu všech pěti metabolitů ellipticinu. S NADPH dochází ke stimulaci tvorby čtyř metabolitů ellipticinu po přidání tohoto proteinu (12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu). S NADPH-generujícím systémem a cyt b₅ dochází taktéž ke stimulaci tvorby těchto metabolitů s výjimkou 13-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu, u kterých dochází vzhledem k možné interakci s proteinem glukosa-6-fosfátdehydrogenasy k poklesu jejich tvorby.

- Ellipticin je metabolizován jaterními mikrosomy obsahujícími cytochromy P450 na pět metabolitů: 7-hydroxyellipticin (M4), 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N²-oxid ellipticinu (M5). Ke studiu byly použity mikrosomy z jater potkanů premedikovaných jednak pregnenolonkarbonitrilem (PCN), jednak Sudanem I, a také jaterní mikrosomy nepremedikovaných potkanů. Kinetika oxidace ellipticinu všemi testovanými potkaními jaterními mikrosomy vykazovala hyperbolickou závislost počáteční rychlosti na koncentraci ellipticinu. Jaterní mikrosomy z nepremedikovaných potkanů oxidovaly ellipticin majoritně na 12-hydroxyellipticin, jehož tvorba značně převyšovala tvorbu ostatních metabolitů a byla také nejvýznamnější i v rámci dalších testovaných mikrosomů. Jaterní mikrosomy z potkanů premedikovaných Sudanem I (induktor cytochromů P450 podrodiny 1A [24]) vykazují pokles tvorby 9-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu oproti kontrolním mikrosomům, ale v případě 7-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu dochází k stimulaci jejich tvorby. Třetí typ zkoumaných mikrosomů, jaterní mikrosomy z potkanů premedikovaných pregnenolon-karbonitrilem (induktor cytochromů P450 podrodiny 3A [24]), projevuje schopnost stimulovat tvorbu všech metabolitů ellipticinu oproti kontrolním mikrosomům i „Sudanovým“ mikrosomům s výjimkou dříve diskutovaného 12-hydroxyellipticinu.

Při účinné indukci jednotlivých podrodin cytochromů P450 se jaterní mikrosomy jeví jako vhodný model pro studium aktivity jednotlivých forem cytochromů P450, alespoň v případě oxidace studovaného substrátu cytochromů P450 - ellipticinu.

Výsledky získané v rámci této diplomové práce prokazují, že stanovené cíle byly splněny. Tyto výsledky jsou také základem pro další detailní studie porovnávající efektivitu lidských cytochromů P450 exprimovaných v modelových eukaryotních a prokaryotních expresních systémech.

7. Seznam použité literatury

- 1 Aimova D., Stiborová M.: *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic* 149(2), 437–440 (2005)
- 2 Ansari B.M., Thompson E.N.: *Postgraduate Medical Journal* 51, 103-105 (1975)
- 3 Arguello F., Alexander M.A., Greene J.F. Jr., Stinson S.F., Jorden J.L., Smith E.M., Kalavar N.T., Alvord W.G., Klabansky R.L., Sausville E.A.: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 124, 19-26 (1998)
- 4 Auclair C., Paoletti C.: *The Journal of Biological Chemistry* 24, 289-295 (1981)
- 5 Battula N.: *The Journal of Biological Chemistry* 264, 2991-2996 (1989)
- 6 Barnes H.J., Arlotto M.P., Waterman M.R.: *Biochemistry* 88, 5597-5601 (1991)
- 7 Carroll A.R., Addepalli R., Fechner G., Smith J., Guymer G.P., Forster P.I., Quinn R.J.: *Journal of Natural Products* 71, 1063–1065 (2008)
- 8 Chun Y.J., Shimada T., Guengerich F.P.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 330, 48–58 (1996)
- 9 Dong J., Porter T.D.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 327, 254–259 (1996)
- 10 Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R.: *Biochemistry* 30, 71 (1991)
- 11 Festy B., Poisson J., Paoletti C.: *FEBS Letters* 17, 321-323 (1971)
- 12 Friedberg T., Pritchard M. P., Bandera M., Hanlon S. P., Yao D., McLaughlin L. A., Ding S., Burchell B., Wolf C. R.: *Drug Metabolism* 31(2), 523–544 (1999)
- 13 Garbett N.C., Graves D.E.: *Current Medical Chemistry - Anti-Cancer Agents* 4, 149-172 (2004)
- 14 Guengerich F. P.: *The Journal of Biological Chemistry* 266, 10019 (1991)
- 15 Hardesty C.T., Chaney N.A., Mead J.A.R.: *Cancer Research* 32, 1884-1889, (1972)
- 16 Heinemann F. S., Ozols J.: *The Journal of Biological Chemistry* 258, 4195 (1983)
- 17 Hubbard P.A., Shen A.L., Paschke R., Kasper C.B., Kim Jung-Ja P.: *The Journal of Biological Chemistry* 276, 29163-29170 (2001)
- 18 Klingenberg M.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75, 376 (1958)

- 19 Kohn K.W., Waring M.J., Glaubiger D., Friedman C.A.: *Cancer Research* 35, 71-76 (1975)
- 20 Kolář M., Kubař T., Hobza P.: *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 13446–13454 (2010)
- 21 Kuo Po-Lin , Hsu Ya-Ling, Chang Cheng-Hsiung, Lin Chun-Ching: *Cancer Letters* 223, 293–301 (2005)
- 22 Kuo Yu-Chun, Kuo Po-Lin, Hsu Ya-Ling, Cho Chien-Yu, Lin Chun-Ching: *Life Sciences* 78, 2550 – 2557 (2006)
- 23 Shi L.M., Myers T.G., Fan Y., O'Connor P.M., Paull K.D., Friend S.H., Weinstein J.N.: *Molecular Pharmacology* 53, 241–251 (1998).
- 24 Lewis D.F.V.: *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism*, Taylor and Francis Ltd (2005)
- 25 Lu C., Wang W., El-Deiry W.S.: *Cancer Biology & Therapy* 7:12, 2039-2046 (2008)
- 26 DeMarini D.M., Cros S., Paoletti C., Lecointe P., Hsie A.W.: *Cancer Research* 43, 3544-3552 (1983)
- 27 Mathé G., Pontiggia P., Orbach-Arbouys S., Triana K., Ambetima N., Morette C., Hallard M., Blanquet D.: *Biomed & Pharmacother* 50, 220-227 (1996)
- 28 Mathé G., Hallard M., Pontiggia P.: *Biomed & Pharmacother* 50, 510-511 (1996)
- 29 Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: *Biomed & Pharmacother* 52, 391-396 (1998)
- 30 Mitsuda M., Iwasaki M.: *Protein Expression and Purification* 46, 401–405 (2006)
- 31 Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J.M., Belehradek J.Jr., Femandjian S.: *FEBS Letters* 273, 71-74 (1990)
- 32 Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B, Saucier J.M., Charra M., Belehradek J.Jr., Femandjian S.: *The Journal of Biological Chemistry* 266, 1820-1829 (1991)
- 33 Moody T.W., Czerwinski G., Tarasova N.I., Michejda C.J.: *Life Sciences* 71, 1005–1014 (2002)
- 34 Moody T.W., Czerwinski G., Tarasova N.I., Moody D.L., Michejda C.J.: *Regulatory Peptides* 123, 187– 192 (2004)

- 35 Mrázová B., *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2006)
- 36 Nebert D. W., Nelson D. R., Feyereisen R.: *Xenobiotica* 19, 1149 (1989)
- 37 Nedelchava V., Gut I.: *Xenobiotica* 24, 1151-1175 (1994)
- 38 Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W.: *Pharmacogenetics* 6, 1 (1996)
- 39 Omura T., Sato R.: *The Journal of Biological Chemistry* 239, 2370 (1964)
- 40 Oprian D.D., Coon M.J.: *The Journal of Biological Chemistry* 257, 8935-8944 (1982)
- 41 Parikh A., Guengerich F.P.: *Protein Expression and Purification* 9, 346-354 (1997)
- 42 LePecq J.B., NGUYEN-DAT-XUONG, Gosse C., Paoletti C.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 5078-5082 (1974)
- 43 Peng Y., Li C., Chen L., Sebt S., Chen J.: *Oncogene* 22, 4478-4487 (2003)
- 44 Phillips I.R., Stephard E.A.: *Cytochrome P450 protocols*, Humana Press, New Jersey (2006)
- 45 Poljaková J., Eckschlager T., Hraběta J., Hřebačková J., Smutný S., Frei E., Martínek V., Kizek R., Stiborová M.: *Biochemical Pharmacology* 77, 1466-1479 (2009)
- 46 Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M.: *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic* 149(2), 449-53 (2005)
- 47 Pritchard M.P., Ossetian R., Li D.N., Henderson C.J., Burchell B., Wolf C.R., Friedberg T.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 345, 342-354 (1997)
48. Rolsted K., Kissmeyer A.M.: *Archives of Dermatological Research* 300, 11-18 (2008)
- 49 Roy M., Fernandez N., Lesca P.: *European Journal of Biochemistry* 172, 593 - 599 (1988)
- 50 Schroer K., Kittelmann M., Lütz S.: *Biotechnology and bioengineering* 106, 699-706 (2010)

- 51 Schwaller M.A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: *The Journal of Biological Chemistry* 270, 22709–22713 (1995)
- 52 Shenkman J.B., Jansson I.: *Pharmacology and Therapeutics* 97, 139-152 (2003)
- 53 Shimada T., Wunsch R.M., Hanna I.H., Sutter T.R., Guengerich F.P., Gillam E.M.J.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, 111–120 (1998)
- 54 Shimada T., Tsumura F., Gillam E.M.J., Guengerich F.P., Inoue K.: *Protein Expression and Purification* 20, 73–80 (2000)
- 55 Speedie M.K., Figue D.V., Blomster R.N.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 18, 171-175 (1980)
- 56 Stiborová M., Rupertová M., Frei E.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1814, 175-185 (2011)
- 57 Stiborová M.: *Sborník, Projekt Otevřená věda Multioborový seminář*, Praha (2005)
- 58 Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Research* 64, 8374–8380 (2004)
- 59 Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračínský M., Eckschlager T., Frei E.: *International Journal of Cancer* 120, 243-251 (2006)
- 60 Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chemické Listy* 93, 229-237 (1999)
- 61 Stiborová M.: *Chemické Listy* 96, 784-791 (2002)
- 62 Stiborová M., Hudeček J., Páca J., Martínek V., Páca J.: *Chemické Listy* 98, 876-890 (2004)
- 63 Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* 4, 146 (1999)
- 64 Stiborová M., Frei E.: *Chemické Listy* 95, 549-555 (2001)
- 65 Stiborová M., Bielerb C.A., Wiesslerb M., Frei E.: *Biochemical Pharmacology* 62, 1675–1684 (2001)
- 66 Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chemical Research in Toxicology* 16, 38-47 (2003)
- 67 Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *International Journal of Cancer* 107, 885–890 (2003)

- 68 Stiborová M., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Kotrbová V., Kukačková K., Janouchová K., Rupertová M., Ryšlavá H., Hudeček J., Frei E.: *General Physiology and Biophysics* 25, 245-261 (2006)
- 69 Vermilion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J.: *The Journal of Biological Chemistry* 256, 266 (1981)
- 70 Voice M.W., Zhang Y., Wolf C.R., Burchell B., Friedberg T.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366, 116–124 (1999)
- 71 Waterman M.R., Jenkins C.M., Pikuleva I.: *Toxicology Letters* 82/83, 807-813 (1995)
- 72 Yamazaki H., Nakajima M., Nakamura M., Asahi S., Shimada N., Gillam E.M.J., Guengerich F.P., Shimada T., Yokoi T.: *Drug Metabolism and Disposition* 27, 999-1004 (1999)
- 73 Yamazaki H., Nakamura M., Komatsu T., Ohyama K., Hatanaka N., Asahi S., Shimada N., Guengerich F.P., Shimada T., Nakajima M., Yokoi T.: *Protein Expression and Purification* 24, 329–337 (2002)
- 74 Weinberg R.A.: *The Biology of Cancer*, Taylor & Francis Group, LLC (2007)
- 75 Wiechelman K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: *Analytical Biochemistry* 175, 231 (1988)
- 76 http://arbres-reunion.cirad.fr/especes/apocynaceae/ochrosia_borbonica_gmel_spreng (19.4.2011)
- 77 <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> (20.4.2011)
- 78 <http://epp.eurostat.eceuropa.eu/portal/page/portal/statistics/themes> (20.4.2011)
- 79 http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html#Andersson_and_Dawson_1991 (2.5.2011)
- 80 http://www.chemicalbook.com/productChemicalPropertiesCB0219721_EN.htm (19.4.2011)
- 81 <http://www.chemsynthesis.com/journals/organic-chemistry/page-190.html> (19.4.2011)
- 82 <http://www.cs.bgu.ac.il/~keasar/bip05/lesson2/homework.html> (15.4.2011)
- 83 http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_interaction.php (20.4.2011)
- 84 <http://www.medicine-raw-materials.com/uploadfile/201003/15/01333537.jpg> (19.4.2011)

85 <http://www.p450.kvl.dk/gallery/CYP3A4.jpg> (21.4.2011)

86 http://www.p450.kvl.dk/gallery/Rn_P450Reduc.jpg (21.4.2011)

87

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.|BRAND_KEY&N4=C3624|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC (20.4.2011)

Svoluji k zapůjčení této bakalářské práce pro studijní účely a žádám, aby byla vedena řádná evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.